



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE

DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE E TERRITORIO

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE E TECNOLOGIE BIOLOGICHE E  
AMBIENTALI  
XXVI CICLO

Analisi della variabilità genetica del sottogenere  
*Quercus* Oerst. in Italia centro-meridionale

Settore scientifico disciplinare: BIO/02

DOCENTE GUIDA:

Ch.ma Prof.ssa Paola Fortini

COORDINATORE:

Ch.mo Prof. Claudio Caprari

DOTTORANDA:

Dott.ssa Gaby Antonecchia

---

a.a. 2013/2014

*A Vincenzo e Francesca*

## INDICE

Introduzione.....	3
Capitolo1 – Il concetto di specie.....	5
1.1 La speciazione.....	6
1.1.2. Speciazione peripatrica.....	7
1.1.3. Speciazione parapatrica.....	7
1.1.4. Speciazione simpatrica.....	7
1.2 Le barriere e isolamento riproduttivo.....	8
1.2.1 Le barriere pre-riproduttive.....	8
1.2.1 Le barriere post-riproduttive.....	9
1.3 Il concetto di ibridazione.....	9
Capitolo 2 - Il caso studio delle querce bianche europee.....	12
2.1 Origine e diffusione delle querce .....	12
2.2 La diffusione delle querce bianche in Europa.....	14
2.3 L'ibridazione nel genere <i>Quercus</i> .....	15
2.4 Sistematica del genere <i>Quercus</i> .....	18
2.5 Caratteristiche e criticità tassonomiche nelle specie indagate.....	20
2.5.1 <i>Q. petraea</i> (Matt.) Liebl.....	21
2.5.2 <i>Q. pubescens</i> Willd.....	23
2.5.3 <i>Q. frainetto</i> Ten. ....	28
2.6 I querceti dell'Italia centro meridionale.....	30
2.6.1 Molise.....	30
2.6.2 Lazio.....	32
2.6.3 Puglia.....	33
Capitolo 3 – Marcatori molecolari utilizzati per lo studio del genere <i>Quercus</i> ....	37
3.1 Tecniche per lo studio dello variabilità genetica.....	37
3.2 Marcatori proteici: isozimi e allozimi.....	39
3.3 Tecniche basate sulla reazione PCR.....	40
3.3.1 PCR multiplex.....	41
3.4 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	42
3.5 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	43
3.6 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	44
3.7 ITS (Internal Transcribed Spacer).....	45
3.8 Microsatelliti nucleari (SSR, Simple Sequence Repeat).....	46
Capitolo 4: Materiali e metodi.....	51
4.1 Provenienza dei campioni.....	51
4.2 Le aree di campionamento.....	55
4.2.1 Molise.....	55
4.2.2 Lazio.....	56
4.2.3 Puglia.....	57
4.3 Estrazione del DNA da foglie .....	58
4.4 Elettroforesi su gel di agarosio.....	59
4.5 Quantificazione del DNA.....	62
4.6 Amplificazione dei microsatelliti .....	62

4.7 Genotipizzazione.....	65
4.8 Il Binning e la fase di assegnazione allelica.....	67
4.9 Elaborazione statistica dei dati.....	68
4.9.1 Metodi Bayesiani.....	69
4.9.2 Metodi basati sulle distanze genetiche.....	70
4.9.2.1 AMOVA.....	70
4.9.2.2 Analisi delle Componenti Principali (PCA).....	71
4.9.3 Variabilità genetica e equilibrio di Hardy-Weinberg.....	72
Capitolo 5: Risultati.....	74
5.1 Il dimensionamento degli alleli: la fase di 'binning'.....	75
5.2 Analisi di classificazione bayesiana.....	52
5.3 Molise.....	73
5.4 Lazio.....	81
5.5 Puglia.....	84
5.6 Principal Component Analysis.....	87
5.7 AMOVA.....	88
5.8 Cluster analysis.....	89
5.6 Analisi delle frequenze alleliche.....	91
5.6.1 Analisi delle frequenze alleliche intra-specifica.....	91
5.6.2 Lazio.....	96
5.6.3 Puglia.....	97
5.7 Analisi delle frequenze alleliche inter-specifica.....	98
Capitolo 6: Discussione dei risultati e Conclusioni.....	102
Bibliografia.....	112
Appendice.....	120
Articoli.....	127



## Introduzione

Il presente dottorato di ricerca si prefigge lo scopo di analizzare la variabilità genetica all'interno di tre specie appartenenti al genere *Quercus* gruppo *Robur* (*Q. frainetto* Ten., *Q. petraea* Liebl. Matt. e *Q. pubescens* Willd.) con particolare riferimento a *Q. pubescens*, focalizzandosi su fenomeni quali l'interfertilità inter-specifica, i flussi genici esistenti tra popolazioni parentali e i fenomeni di ibridazione e introgressione. La maggior parte delle querce presenta infatti una spiccata variabilità fra gli individui legata all'interfertilità interspecifica che stabilisce un flusso genico (*gene flow*) non solo fra le specie del genere *Quercus* ma anche all'interno degli sciame di ibridi da loro derivati e fra gli ibridi e le relative specie parentali. Questi meccanismi di introgressione favoriscono l'ampliamento della gamma delle variabili fenotipiche intraspecifiche, facendo sì che il genere *Quercus* sia senza dubbio uno dei generi forestali più ricchi in specie e più controversi.

La nota criticità tassonomica del genere *Quercus* è infatti evidenziata dai numerosissimi *taxa* descritti e spesso di incerta collocazione. Ciò rende estremamente controversa la sistematica di questo genere, determinando non poche difficoltà nella definizione e nella gerarchia di numerosi *taxa* e complicando la comparazione tra i diversi sistemi tassonomici elaborati. Le revisioni tassonomiche più recenti arrivano a descrivere da 394 a 448 specie quercine distribuite nel solo emisfero boreale (Nixon, 1993). Un classico esempio è rappresentato dal gruppo di *Quercus pubescens sensu latu* che risulta particolarmente critico per la sua particolare variabilità morfologica e suddivisione in differenti specie (es. *Q. dalechampii* Ten., *Quercus pubescens* Willd., *Q. virgiliana* Ten.).

Altra fondamentale conseguenza del fenomeno del gene flow è l'introduzione, verso l'interno o verso l'esterno di un pool genetico, di nuovi alleli che possono influenzare la struttura genetica di una popolazione. Ciò rappresenta un fattore evolutivo molto importante poiché, da un lato può alterare complessi genici ben integrati e dall'altro, può contribuire a conservare la diversità genetica, permettendo alle popolazioni di rispondere alle mutevoli condizioni ambientali. In particolare, si sospetta che l'ibridazione e l'introgressione giochino un ruolo di fondamentale importanza nei fenomeni di ricolonizzazione post-glaciale delle querce in Europa (Petit *et al.*, 2003)

ma, attualmente, sono ancora poche le ricerche che si sono concentrate sulle conseguenze delle dinamiche di ibridazione all'interno di questo complesso di specie (Lepais *et al.* 2009, Lepais & Gerber, 2011).

Alla luce di questi aspetti, le ricerche condotte nel presente dottorato hanno riguardato:

- 1) Lo studio della variabilità genetica a differente scala geografica, di popolazioni naturali, miste e pure, di *Q. pubescens* nell'Italia centro-meridionale (analisi intra-specifica);
- 2) l'analisi dei flussi genici rilevati nelle popolazioni parentali di *Q. frainetto*, *Q. petraea* e *Q. pubescens* (analisi inter-specifica).

Entrambi questi aspetti costituiscono temi centrali nello studio della diversità genetica e delle dinamiche di ibridazione delle popolazioni naturali del genere *Quercus*, anche al fine di ottenere informazioni dagli individui di incerta collocazione tassonomica e per l'elaborazione di corrette strategie di conservazione. Complessivamente, per la presente ricerca, sono stati sottoposti a caratterizzazione molecolare 905 individui provenienti dall'Italia Centro meridionale. La ricerca è stata impostata sull'utilizzo di tecniche bio-molecolari di *caratterizzazione genetica (genotyping)* basate sull'identificazione di specifiche regioni del DNA note come marcatori molecolari, *loci* cromosomici le cui varianti alleliche possono essere identificate analizzando direttamente il DNA. La scelta dei marcatori è stata fatta in base a caratteristiche ben precise: specificità, polimorfismo, codominanza, facilità nell'individuazione e ripetibilità. Le analisi condotte hanno previsto l'analisi di marcatori molecolari di tipo *microsatelliti nucleari* (Simple Sequence Repeats - SSRs) contraddistinti da caratteristiche ereditabili biparentali. E' stato utilizzato un pool costituito da 12 SSRs selezionati attraverso precisi criteri sperimentali presso i laboratori BIOGEO dell'INRA dell'Università di Bordeaux (Francia). Attualmente i microsatelliti nucleari sono tra i marcatori più utilizzati negli studi di genetica di popolazione, in grado di fornire informazioni utili per lo studio del problema dell'identificazione varietale e della tipizzazione genetica del genere *Quercus*. I marcatori molecolari scelti nella presente ricerca sono, attualmente, tra i più utilizzati nello studio della variabilità delle querce bianche e con questa metodologia sono state, al momento, studiate alcune popolazioni pure e miste, sia in Francia che in Italia. Attraverso l'uso di primers specifici, complementari alle regioni che fiancheggiano le sequenze ripetute, è stato possibile amplificare con il metodo della PCR multiplex queste zone del genoma e renderle, quindi, rilevabili mediante tecniche elettroforetiche.

I primers utilizzati hanno consentito di amplificare i singoli microsatelliti permettendo un'analisi genetica accurata, mettendo in evidenza all'interno delle popolazioni analizzate una diversità genetica difficilmente rilevabile con altri tipi di marcatori, poiché i polimorfismi sono localizzati in regioni ipervariabili e non espresse del genoma. L'elevato numero dei campioni sottoposti a caratterizzazione molecolare e di loci microsatellite hanno restituito una notevole mole di informazioni e di attendibilità del risultato, permettendo di valutare il livello di variabilità inter ed intraspecifica delle specie studiate e di affiancare i risultati anche ad analisi di tipo morfologiche e micro-morfologiche (Fortini *et al.*, 2013;Viscosi *et al.* 2012).

## Capitolo 1

### Il concetto di specie

Il concetto di specie è alla base della classificazione degli organismi viventi e, nella sistematica biologica, rappresenta l'unità fondamentale di base del sistema di classificazione. Questo concetto, da molto tempo al centro dell'attenzione di biologi e naturalisti, ha subito notevoli modifiche parallelamente al progredire delle conoscenze. Storicamente è riconducibile al concetto di specie tipologica, secondo cui gli individui della stessa specie non sono correlati tra loro, se non attraverso il rapporto che lega ciascuno di essi al medesimo "tipo" di appartenenza. Su questo criterio si fonda la sistematica Linneana: i caratteri utilizzati nella sistematica Linneana sono essenzialmente morfologici. Grazie ad essi il sistematico stabilisce l'olotipo, cioè un individuo "tipico" con funzione di modello della specie. Al "tipo" sono di volta in volta confrontati i vari individui che è necessario identificare tassonomicamente. L'affermarsi delle concezioni evoluzionistiche ha proposto le specie come *'entità storiche'*, suscettibili di continui cambiamenti durante il corso del tempo. Da questi presupposti deriva il concetto di specie biologica di T. Dobzhansky ed E. Mayr che, dal 1940, è stato modificato e riscritto più volte, fino all'enunciazione di Mayr (1983):

*«Una specie è una comunità riproduttiva di popolazioni, riproduttivamente isolata dalle altre, che in natura occupa una nicchia specifica».*

La specie viene in questo modo definita in base alle proprietà delle popolazioni, anziché in dipendenza dei caratteri di un singolo organismo introducendo il concetto della riproduzione nelle popolazioni che costituiscono una determinata specie (definizione multidimensionale; Beurton, 2002). Un secondo importante concetto che deriva da questa definizione, è il concetto di isolamento riproduttivo tra le specie (definizione adimensionale, Beurton, 2002) che impedisce lo scambio genetico tra le popolazioni innescando così il processo della speciazione per divergenza.

#### 1.1 La speciazione

La speciazione è un processo di diversificazione lungo una linea evolutiva che porta alla formazione di nuove specie zoologiche e botaniche, a partire da una di origine, mediante meccanismi di isolamento riproduttivo che impediscono lo scambio genetico tra le popolazioni.

Le modalità di speciazione di origine bio-geografica sono di quattro tipi:

- speciazione allopatrica,
- speciazione peripatrica,
- speciazione parapatrica,
- speciazione simpatrica.

**1.1.2. Speciazione allopatrica.** Questo tipo di speciazione si verifica quando una popolazione della specie originaria viene divisa in due da una barriera geografica, interrompendo il flusso di geni tra le due; durante questo isolamento, entrambe le popolazioni vanno incontro a modificazioni genetiche per cui, anche se successivamente si ritornasse a una condizione di simpatria – ossia le popolazioni occorrono nella stessa area - i meccanismi di isolamento riproduttivo sono sufficienti per tenere separate le due popolazioni (Mayr, 1942).

**1.1.2. Speciazione peripatrica.** La speciazione peripatrica avviene in popolazioni fondatrici periferiche (E. Mayr, 1963) e, in questo caso, una nuova specie può avere origine da pochi individui della specie madre, che hanno occupato un nuovo territorio, per es., un'isola, per fondare una nuova popolazione che sarà caratterizzata, geneticamente, da una piccola parte del pool genico della popolazione originale.

**1.1.3. Speciazione parapatrica.** Si verifica in popolazioni geograficamente in contatto quando i confini degli areali di specie affini si toccano senza sovrapporsi (Coyne & Orr, 1988). Quando due taxa sono in fase di differenziamento, i meccanismi di isolamento riproduttivo non sono ancora completamente efficienti, per cui in habitat contigui potrà esistere una zona di ibridazione caratterizzata dalla presenza, limitata, di flusso genico. Gli ibridi risultanti tendono ad essere eliminati dalla selezione poiché sfavoriti dagli habitat parentali e da pressioni selettive che contribuiscono alla comparsa dell'isolamento genetico definitivo. Nelle piante questo tipo di speciazione è molto comune (Wang *et al.*, 1997).

**1.1.4. Speciazione simpatrica.** Si definisce speciazione simpatrica l'emergere di due specie distinte a partire da una popolazione comune che occupa lo stesso territorio (Gavrilets, 2003). In questo la formazione di nuove specie avviene quindi in presenza di flusso genico e consiste così nella comparsa dell'isolamento riproduttivo senza che vi sia un effettivo isolamento geografico. Questo tipo di speciazione può avvenire in maniera graduale o rapida (*quantum speciation*). Nella condizione più comune in natura (speciazione simpatrica graduale) le modificazioni del pool genico non conferiscono un

immediato isolamento riproduttivo, favorendo l'instaurazione di meccanismi di isolamento blandi che solo successivamente divengono più efficienti, favoriti e guidati dalla selezione naturale.

Ad esempio, due gruppi di individui della medesima specie possono vivere in stretta simpatria, e contemporaneamente mostrare stagioni riproduttive sfasate nel tempo: in questo modo gli individui di una specie non possono incrociarsi con quelli dell'altra sebbene siano ancora fisiologicamente interfecondi. La speciazione simpatrica è stata studiata in numerose specie, sia in ambito vegetale che animale. Ad esempio, per quanto riguarda le piante, indagini ecologiche e molecolari, hanno riscontrato che le palme subtropicali *Howea forsteriana* e *H. belmoreana* (*Arecaceae*) si sono separate a partire da un antenore comune nell'isola australiana di Lord Howe a causa di differenti caratteristiche del suolo in zone diverse dell'isola. Queste caratteristiche ecologiche hanno così indotto un differenziamento nel periodo di fioritura tra due gruppi di individui, che, guidate da speciazione simpatrica, hanno subito divergenze progressive fino a divenire due specie distinte (Savolainen *et al.*, 2006).

## **1.2 Le barriere e isolamento riproduttivo**

L'isolamento riproduttivo è quindi uno dei presupposti principali perché possa originarsi una nuova specie e consiste nella separazione genetica di una popolazione da altre geneticamente compatibili (Lepais, 2008), la presenza di barriere riproduttive più o meno forti è legata al tipo di speciazione e può condurre al totale isolamento riproduttivo tra le specie. Le barriere sono di due tipi, classificabili in base al momento in cui sono coinvolte: barriere pre-riproduttive e post-riproduttive (E. Mayr, 1954).

### **1.2.1 Le barriere pre-riproduttive**

Impediscono a due popolazioni di venire in contatto tra loro e sono legate a fattori ecologici-ambientali o comportamentali. L'isolamento bio-geografico negli animali, ad esempio, impedisce a due popolazioni di venire in contatto tra loro. L'isolamento ambientale impedisce agli stessi di venire in contatto, pur vivendo in una stessa area geografica, poiché possono scegliere habitat differenti nei quali vivere e accoppiarsi.

Negli animali, l'isolamento comportamentale (etologia) ricopre un ruolo di fondamentale importanza nell'isolamento riproduttivo tra le specie e, in questo caso, il riconoscimento tra maschio e femmina è essenziale per la riproduzione in quanto gli individui di una specie possono non riconoscere, o non accettare, per la riproduzione individui di un'altra specie. In alcune specie vegetali, la riproduzione è mediata dal

comportamento degli individui di un'altra specie. Per esempio, la possibilità che due specie di piante producano ibridi può dipendere dalle preferenze alimentari dei loro impollinatori e spesso le caratteristiche stesse del fiore possono favorire o meno l'isolamento riproduttivo poiché possono attrarre impollinatori diversi (Martin *et al.*, 2008; Kay, 2006).

Molte specie presentano invece periodi riproduttivi caratterizzati da determinate «finestre» temporali che spesso non si sovrappongono con quelli altre specie, saranno perciò riproduttivamente isolate da una barriera temporale. Infatti, in alcune specie di piante, la fenologia è una componente importante nei processi di isolamento riproduttivo (Martin *et al.*, 2007; Gerard *et al.*, 2006) in quanto specie con gli stessi periodi di fioritura o con periodi di fioritura parzialmente sovrapposti avranno più opportunità di interagire rispetto a specie con fenologia distinta.

### **1.2.2 Le barriere post-riproduttive**

L'isolamento da barriere post-riproduttive include meccanismi di isolamento riproduttivi interspecifici che impediscono la fecondazione stessa o la produzione di ibridi fertili. In questo caso si parla di meccanismi di isolamento pré-zigotici e post-zigotici (Lepais, 2008). Nel primo caso (isolamento pré-zigotico) l'isolamento avviene prima della fecondazione e interessa le fasi precoci del processo riproduttivo: il gameti vengono trasferiti ma la formazione dello zigote non avviene. Nelle piante è rappresentato da incompatibilità gametica, presenza di polline conspecifico ecc... (Lepais *et al.*, 2012).

Nel secondo caso (isolamento post-zigotico) l'isolamento avviene in seguito alla riproduzione: lo zigote si forma, ma non si sviluppa un individuo adulto vitale e fertile. Nelle piante, questo tipo di isolamento interessa le fasi tardive post-fecondazione quali il tasso di germinazione e di sopravvivenza degli individui. Le barriere post-zigotiche possono essere a loro volta suddivise in barriere estrinseche e intrinseche. Nelle prime la fitness dell'ibrido dipende dal contesto (gli ibridi hanno un fenotipo intermedio e sono sfavoriti negli habitat delle specie parentali) mentre nelle barriere intrinseche post-zigotiche la fitness dell'ibrido non dipende dal contesto (si ha la *non vitalità* dell'ibrido oppure la sua sterilità o bassa fecondità - Lepais *et al.*, 2012).

### **1.3 Il concetto di ibridazione**

Il concetto di ibridazione è attualmente argomento di dibattito sia per quanto riguarda la Sistematica che la Biologia Evolutiva. Il superamento delle barriere riproduttive

responsabili della formazione e della differenziazione delle specie è un fenomeno comune in natura che comporta il rimescolamento dei pool genici delle specie parentali. Nel regno animale i gruppi di individui *interfertili* coincidono con gruppi morfologici, ecologici e geografici distinti dove l'ibridazione è principalmente impedita dai meccanismi di isolamento pre-riproduttivo tra individui appartenenti a specie diverse.

Nel regno vegetale invece, l'incontro tra gameti di specie diverse è un fenomeno comune ma la produzione di ibridi è generalmente limitata dai meccanismi di isolamento post-riproduttivi caratterizzati da bassi livelli di fertilità e di vitalità degli ibridi. Questo è uno dei motivi principali per cui si è sempre ritenuta l'ibridazione tra specie vegetali un processo di modesto ruolo evolutivo (Mayr, 1942; Wagner, 1970; Barton & Hewin, 1985).

Esistono in proposito tre teorie sul significato evolutivo del concetto di ibridazione. Il primo e più diffuso tra gli zoologi, considera l'ibridazione come un processo che non ha alcuna conseguenza evolutiva a lungo termine rappresentando una sorta di “rumore di fondo” (Bruni, 2010) nei processi di speciazione (Wagner, 1970; Mayr, 1942; Schemske, 2000). La seconda ipotesi sostiene che l'ibridazione è un fenomeno importante nel processo di speciazione, in termini di rafforzamento dell'isolamento riproduttivo (Harrison, 1993). Secondo alcune stime (Stace, 1987) sembra che circa il 50 - 70% delle Angiosperme attualmente presenti in natura si sia originato in seguito a processi di ibridazione. La terza ipotesi considera l'ibridazione come una fonte di novità evolutiva (Anderson & Stebbins 1954; Rattenbury, 1962).

I primi studi sulle conseguenze evolutive dell'ibridazione in campo vegetale portarono alla consapevolezza che è possibile creare una nuova specie ibrida, stabile e separata dalle specie parentali, raddoppiandone (o variando) il numero dei suoi cromosomi (allopoliploidia - Winge, 1917). Anderson e Hubricht (1938) definirono, successivamente, il concetto di introgressione (o ibridazione introgressiva) come il fenomeno al quale si deve il passaggio di geni da una specie all'altra attraverso una barriera interspecifica incompleta. In termini evolutivi, ciò può portare sia alla *disintegrazione genetica* (fusione di specie parentali; Mayr, 1991) che al *reinforcement* (rafforzamento dell'isolamento riproduttivo; Howard, 1986). Infine, studi sperimentali, hanno rivelato che l'ibridazione e l'ibridazione introgressiva potrebbero facilitare, mediante il flusso genico, l'evoluzione adattativa delle popolazioni, il cui genotipo è capace di colonizzare nuovi habitat (Anderson & Stebbins, 1954). Alla luce di questi concetti, l'ibridazione



venne così descritta come un importante processo (Anderson, 1949) per lo scambio di caratteri adattativi tra le specie. Gran parte degli ibridi mostra un successo riproduttivo inferiore rispetto a quello delle relative specie parentali, infatti, generalmente, la vitalità e la fertilità degli ibridi di prima generazione sono più basse di quelle dei parentali (Dobzhansky, 1937), ipotesi confermata principalmente nelle specie che presentano forti barriere post-impollinazione (Bruni, 2010). Al contrario, secondo alcuni autori, il genotipo ibrido può essere, in particolari situazioni, in grado di adattarsi meglio delle specie parentali ad alcuni ambienti determinando un notevole contributo evolutivo (Anderson, 1948; Moore, 1977; Arnold, 1997) mostrando una fitness uguale o maggiore di quella delle specie parentali (Bruni, 2010). Significative associazioni genotipo-ambiente sono state osservate in sciami di ibridi localizzati in ambienti diversi da quelli dei parentali indicando che ci possa essere una selezione positiva per il genotipo ibrido quando si trova in un ambiente ad esso favorevole: l'occupazione di una diversa nicchia ecologica può generare una nuova linea evolutiva (Bruni, 2010). Sotto quest'ottica i fenomeni dell'ibridazione e dell'ibridazione introgressiva, possono rappresentare un'importante fattore evolutivo nel regno vegetale (Rieseberg, 1997), ragion per cui, le zone di ibridazione sono da sempre oggetto di studio per indagare su fenomeni come la speciazione (Burke e Arnold, 2001; Rieseberg *et al.*, 2002). Negli ultimi anni, l'utilizzo di tecniche molecolari e statistiche innovative, affiancate ai tradizionali metodi morfometrici, ha permesso di indagare ulteriormente il fenomeno del flusso genico permettendo ulteriori approfondimenti in questo ambito.

## Capitolo 2

### Il caso studio delle querce bianche europee

#### 2.1 Origine e diffusione delle querce

Il genere *Quercus* (*Fagaceae*) costituisce uno dei gruppi maggiormente diffusi e ricchi in specie dell'emisfero boreale (Frodin, 2004). Le querce decidue sono importanti componenti delle foreste temperate del Nord America e dell'Eurasia, mentre le specie sempreverdi sono rappresentative dei boschi mediterranei e delle foreste tropicali. Si tratta di un gruppo arcaico, sono stati infatti ritrovati reperti fossili appartenenti a questo genere in tre continenti: resti di ghiande e amenti, granuli pollinici e foglie sono stati rinvenuti in depositi del Nord America (Bones, 1979; Manchester, 1994), in Cina (Jiang, 1993) e in Europa (Kvaček & Walther, 1989), di cui i più antichi risalgono all'Eocene. La comparsa quasi simultanea delle querce su questi tre continenti ha sollevato la problematica dell'origine geografica e della diffusione del genere *Quercus*. Attualmente sono state avanzate due ipotesi per ricostruirne la storia evolutiva. Secondo la prima ipotesi (Zhou, 1992 - fig.2.1), il genere *Quercus* è apparso nel Sud-Est asiatico e, durante il Paleocene, si è separato dal genere *Trigonobalanus* ed è migrato in due direzioni: verso l'Europa e l'America del Nord (attraverso il passaggio Nord Atlantico, prima dell'Eocene, e via stretto di Bering, dopo il Miocene).

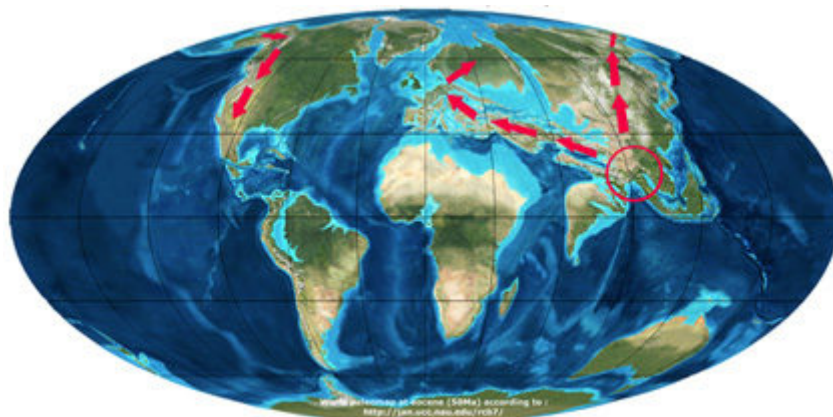


Fig.2.1. Ipotesi di Zhou (1992) sulla diffusione del genere *Quercus*.  
Da: <https://w3.pierroton.inra.fr/QuercusPortal/index.php>

In base alla seconda ipotesi (Manos e Stanford, 2001 e Trelease, 1924 – fig.2.2), il genere *Quercus* deriva dai boschi di latifoglie ampiamente distribuiti in tutto l'emisfero settentrionale all'inizio del Terziario. Il genere *Quercus*, ulteriormente separato a seguito della separazione tra i continenti, si è differenziato dal gruppo ancestrale

costituente la foresta boreale-tropicale originaria. Come risultato le querce si sono diffuse nei diversi continenti come vicarianti dell'Asia e del Nord America. In Asia il "gruppo ancestrale" si è differenziato nel subgenere *Cyclobalanopsis* e nel gruppo *Cerris* del genere *Quercus*. Le specie del gruppo *Cerris* migrarono poi verso ovest e verso l'Europa.

- In America, il "gruppo ancestrale" si è differenziato nei gruppi *Lepidobalanus* (querce bianche), *Protobalanus* e *Erythobalanus* (querce rosse). Le querce bianche migrarono successivamente dal Nord America all'Asia e in seguito in Europa.

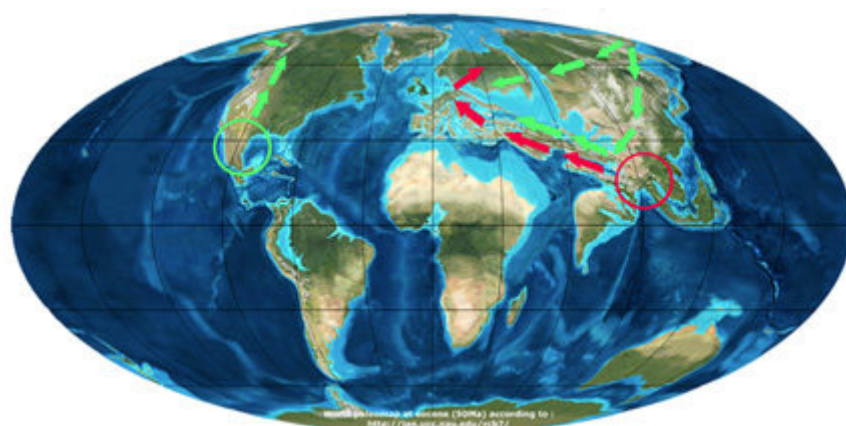


Fig.2.2. Ipotesi di Manos *et al.* (2001) sulla diffusione del genere *Quercus*.  
Da: <https://w3.pierroton.inra.fr/QuercusPortal/index.php>

Nonostante il disaccordo sull'origine del genere, i paleobotanici concordano sul fatto che vi fu una diversificazione estremamente rapida del genere *Quercus* durante l'Oligocene e il Miocene come risposta ad importanti variazioni climatiche. La maggior parte dei resti fossili di quel periodo sono simili ai campioni esistenti, ragion per cui si ritiene che la maggior parte delle specie del genere *Quercus* oggi esistenti era già presente nella metà del Miocene (Trelease, 1924; Axelrod, 1983).

La successiva diffusione di questo genere è avvenuta in concomitanza delle forti modificazioni ambientali (Axelrod, 1983) che hanno caratterizzato la fine del Terziario e tutto il Quaternario. In particolare, le glaciazioni del quaternario hanno inciso sulla distribuzione della copertura vegetale che si è ridotta ad aree rifugio dando vita a nuove migrazioni al sopraggiungere di ogni nuova fase temperata. Queste oscillazioni climatiche hanno agito come forti forze selettive, favorendo le specie in grado di adattarsi ad habitat instabili (Dynesius e Jansson, 2000), ed incidendo così sul ridotto numero di specie che occupano la grande distribuzione continentale (*Q. robur* in

Europa, *Q. alba* in America e *Q. acutissima* in Asia). Le migrazioni glaciali ed interglaciali hanno profondamente influenzato la diversità genetica della specie, ma in maniera sostanzialmente diversa tra il Nord America e l'Europa (Grivet *et al.*, 2006; Kremer *et al.*, 2010).

## **2.2 La diffusione delle querce bianche in Europa**

Le testimonianze fossili raccolte finora indicano le tre penisole del Mediterraneo (la penisola iberica, quella italiana e quella balcanica) come i principali rifugi per molti generi, incluso il genere *Quercus* (Brewer *et al.* 2002). A partire da 13.000 anni fa, dalle aree rifugio le popolazioni di querce colonizzarono il continente Europeo (Petit *et al.*, 2002c); l'occupazione di nuove nicchie divenute disponibili favorì una rapida differenziazione morfologica ed ecologica, mantenendo tuttavia la nota interfertilità tra specie che caratterizza alcuni gruppi di questo genere, come ad esempio il subgenere *Quercus*. L'antica origine del genere *Quercus* è confermata dall'ampio areale, esteso alle zone temperate di tutto l'emisfero boreale, con penetrazioni nelle zone subtropicali (Camus, 1936-1954).

Questo genere ha potuto quindi beneficiare di un lungo cammino evolutivo che ha dato origine a numerosi gruppi tassonomicamente distinti, la cui differenziazione è da attribuire principalmente all'isolamento geografico e alla speciazione ecologica. Tuttavia, le modalità e la velocità di migrazione variano da specie a specie e dipendono fortemente dalle caratteristiche biologiche delle singole specie, in particolare dai meccanismi di dispersione del seme, che nelle querce è affidata principalmente alla gravità (disseminazione propinqua), e in parte a uccelli e piccoli mammiferi responsabili delle disseminazione a grandi distanze (longinqua). I processi evolutivi legati alle rotte migratorie hanno agito con intensità tale da determinare la proliferazione di tassonomico differenti morfologie (Brullo *et al.*, 1999).

Questi fenomeni migratori del post-glaciale, in Europa sono stati ampiamente studiati con l'integrazione delle tecniche molecolari (cpDNA) e palinologiche (Brewer *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2002a, 2002c), evidenziando dinamiche di importanti flussi migratori verso nord Europa (fig. 2.3). In Europa sono stati ricostruiti i flussi migratori di quarantadue differenti aplotipi, raggruppati in sei linee parentali. In Italia dalla distribuzione degli aplotipi, si è osservato che le querce italiane provengono maggiormente da due aree rifugio, localizzate in Sicilia e nei Balcani (Fineschi & Vendramin, 2004).

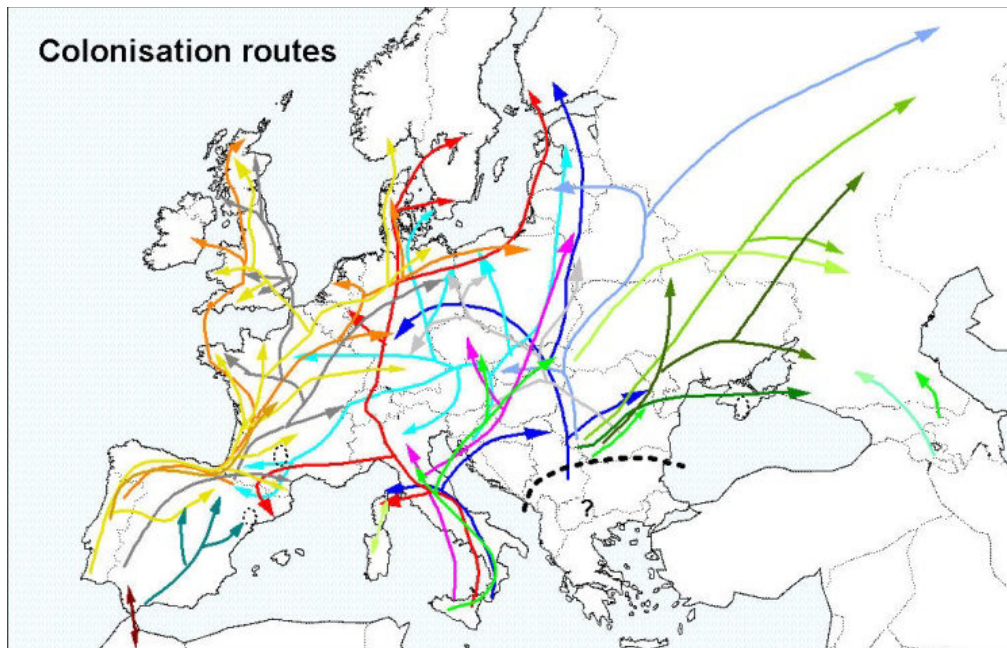


Fig.2.3. Illustrazione dei cicli di ricolonizzazione post-glaciale, costruiti sulla distribuzione degli aplotipi del subgen. *Quercus* in Europa. (da Petit *et al.*, 2003).

### 2.3 L'ibridazione nel genere *Quercus*

L'ibridazione è un fenomeno comune e ampiamente studiato nel genere *Quercus* che rappresenta un importante fattore biologico in termini di evoluzione di queste specie (Rieseberg, 1997). L'interfertilità nelle querce bianche favorisce infatti il flusso genico sia fra queste specie ma anche all'interno degli sciami ibridi da loro derivati e fra gli ibridi e le relative specie parentali. Studi su incroci controllati in Nord America (Cottam *et al.*, 1982) illustrano l'interfertilità di molte specie appartenenti a questo gruppo. Muller nel 1952, attraverso descrizione morfologica, definisce l'ibridazione tra 8 coppie di specie evidenziando che il tasso di ibridazione dipende da fattori che influenzano la sopravvivenza degli ibridi tra cui le caratteristiche ecologiche delle specie parentali. In Europa, gli areali di molte specie del subgen. *Quercus* coincidono ed è stato comprovato un notevole flusso genico inter-specifico e la relativa esistenza di un vasto numero di ibridi (Grandjean & Sigaud, 1987). Ad esempio, è appurato che *Q. robur* ha delle frequenze d'incrocio maggiori quando impollinata con polline proveniente da *Q. petraea* piuttosto che il contrario e quindi l'incrocio avviene di norma nella direzione da *Q. petraea* (impollinante) a *Q. robur* (portaseme) (Bacilieri *et al.*, 1993; Bacilieri *et al.*, 1994).

In parte i processi di ibridazione introgressiva sono stati amplificati dalle attività umane che hanno aumentato la frammentazione della superficie forestale (fig.2.4) e quindi la

capacità di dispersione dei pollini, ponendo in contatto riproduttivo popolazioni lontane (Petit *et al* 2002c).

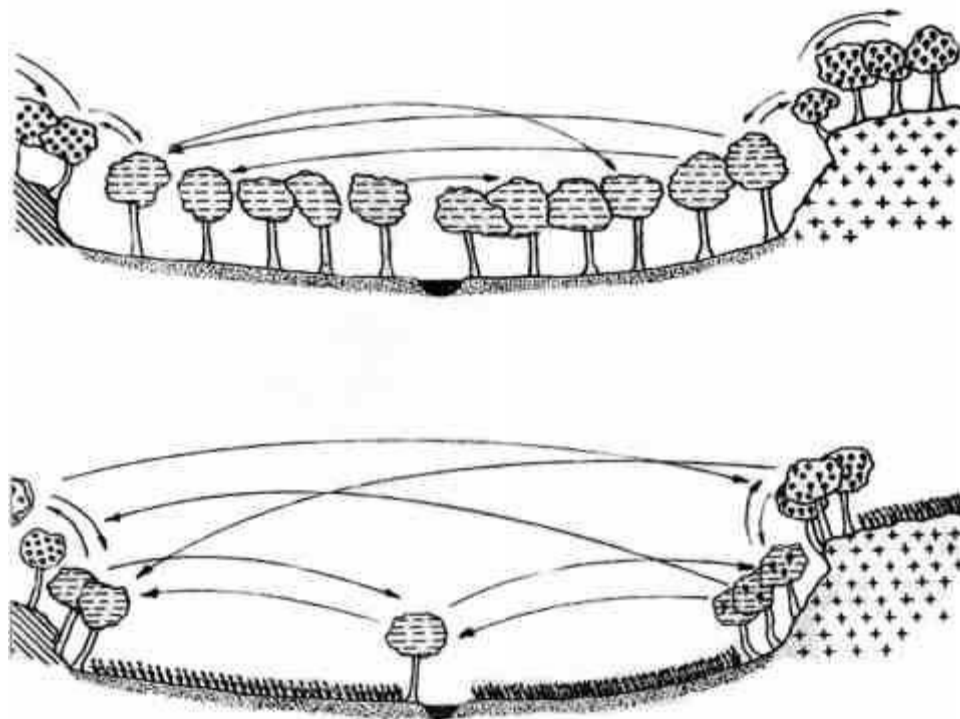


Fig. 2.4. Ipotesi di meccanismo d'ibridazione nelle querce europee (da Pignatti, 1982).

Ciò ha favorito i processi di ibridazione, che hanno portato alla formazione di individui ibridi. La situazione a livello tassonomico è ulteriormente complicata poiché gli ibridi risultano essere interfertili, incrociandosi sia con le specie parentali di partenza che con altri ibridi, dando origine ad una progenie che spesso è difficile identificare con certezza. L'interfertilità stabilisce così un flusso genico, a volte molto intenso, non solo fra le specie ma anche all'interno degli sciami ibridi da loro derivati e fra gli ibridi e le relative specie parentali. In particolare, le querce bianche vivono comunemente in condizioni di simpatria, e ciò le rende particolarmente adatte allo scambio di geni ed alla produzione di individui ibridi (Rushton, 1993; Williams, Boecklen & Howard, 2001; Tovar-Sanchez & Oyama, 2004; Lepais *et al.*, 2009). Inoltre, si sospetta che l'ibridazione e l'introgresione abbiano giocato un ruolo di fondamentale importanza nei fenomeni di ricolonizzazione post-glaciale delle querce in Europa (Petit *et al.* 2003a, 2003b).

Alcuni studiosi sostengono che, le continue ibridazioni con conseguente formazione di numerose nuove combinazioni, poste al vaglio della selezione, rendano i genotipi più

facilmente adattabili al mutare delle condizioni ambientali, in altre parole particolarmente “plastici”. La presenza di “specie” non fissate con barriere intraspecifiche dunque, ne aumenterebbe la *fitness*, aumentando notevolmente la flessibilità adattativa delle popolazioni (Roma-Marzio, 2011). A favore di questa ipotesi è possibile notare che in alcuni casi si ritrovano delle entità ibride in assenza dei parentali. Ad esempio, Roma-Marzio (2011) riporta che nel Salento sono stati rilevati esemplari ibridi di farnia (*Quercus robur* L.), ma non ne sono stati rinvenuti esemplari puri; in aggiunta ipotizza sulla possibile scomparsa della specie parentale a causa delle modifiche ambientali, e sul fatto che oggi tale specie riuscirebbe a sopravvivere solo attraverso questi ibridi.

Meccanismi come l’ibridazione e l’introgressione portano così alla proliferazione di individui ibridi fertili e quindi alla manifestazione di una notevole gamma di caratteri morfologici intermedi rispetto a quelli delle specie parentali ampliando la gamma delle varietà fenotipiche intraspecifiche (Gellini & Grossoni, 1997). La nota criticità tassonomica del genere *Quercus* è infatti dovuta ai numerosissimi *taxa* descritti e spesso di incerta collocazione. Secondo Burger (1975), applicando il concetto biologico di specie al genere *Quercus*, ci sarebbe uno sconvolgimento della nomenclatura, poiché la specie binomiale non corrisponderebbe a quella biologica, che invece sarebbe equivalente ai sottogeneri e alle sezioni. Ciò rende estremamente controversa la sistematica di questo genere, determinando non poche difficoltà nella definizione e nella gerarchia di numerosi *taxa* specialmente a livello di specie e complicando la comparazione tra i diversi sistemi tassonomici elaborati.

In particolar modo, nella penisola italiana, il gruppo di *Quercus pubescens sensu lato* risulta particolarmente critico per la sua elevata variabilità morfologica e per la suddivisione in differenti specie ad es. *Quercus pubescens* Willd., *Q. virgiliana* Ten., *Q. dalechampii* Ten. (Di Pietro *et al.* 2012). Più recentemente, l’uso di marcatori molecolari per lo studio della variabilità e del grado di differenziazione genetica delle querce bianche ha permesso di caratterizzare geneticamente gli individui riconducendoli alle specie pure o inquadrandoli come individui ibridi. Sempre più numerosi sono infatti i lavori che affrontano con l’utilizzo di microsatelli nucleari lo studio di popolazioni simpatriche di querce costituite da più specie e dai loro ibridi (Muir & Schlotterer, 2005; Curtu, Gailin & Finkeldey, 2007a, Curtu *et al.*, 2007b; Gugerli *et al.*, 2007; Lepais *et al.*, 2009; Lopez de Heredia *et al.*, 2009; Salvini *et al.*, 2009; Viscosi *et al.*

2009, 2012). In letteratura sono presenti studi su boschi misti del genere *Quercus* (Bulgaria, Germania, Grecia, Repubblica Ceca, Slovacchia e Svizzera) in cui sono state studiate comunità miste di *Q. petraea* e *Q. robur* (Gomory *et al.*, 2001; Gugerli *et al.*, 2007, 2008; Neophytou *et al.*, 2010). In Spagna sono stati rilevati querceti misti di *Q. petraea* e *Q. pyrenaica* Willd. (Valbuena-Carabana *et al.*, 2005, 2007) e in Romania sono stati analizzati popolamenti misti di *Q. frainetto*, *Q. petraea*, *Q. pubescens* e *Q. robur* (Curtu *et al.*, 2007, 2009, 2011). Numerosi studi sono stati effettuati in Francia su boschi misti di *Q. petraea*, *Q. pubescens*, *Q. pyrenaica* e *Q. robur* (Lepais *et al.*, 2006, 2009) mentre in Germania, sono stati rilevati popolamenti di *Quercus petraea*, *Quercus pubescens* e *Quercus robur* (Neophytou *et al.*, 2013) e a Cipro sono stati analizzati boschi di *Q. alnifolia* Poech. e *Q. coccifera* L. (Neophytou *et al.*, 2013). Per quel che riguarda l'Italia, sono presenti studi effettuati in Toscana su popolazioni miste di *Q. pubescens* e *Q. petraea* (Bruschi *et al.*, 2000; Salvini *et al.*, 2009). Non risultano in letteratura studi effettuati con SSRs su popolamenti misti con *Q. pubescens*, *Q. robur* e *Q. frainetto* precedenti al 2009 (Viscosi *et al.*, 2009). In particolare, numerosi sono i lavori condotti in periodi più o meno recenti relativi alla problematica della variabilità di *Q. pubescens* (Bussotti & Grossoni, 1997; Brullo *et al.* 1998, 1999; Jerše & Batič, 2007; Trinajstić, 2007; Fortini *et al.* 2007, 2009; Viscosi *et al.* 2009; Coldea *et al.* 2010), ma solo i più recenti affrontano l'argomento mediante caratterizzazione molecolare con SSR (Enescu *et al.* 2013; Neophytou *et al.* 2013; Viscosi *et al.* 2009).

## 2.4 Sistematica del genere *Quercus*

La famiglia delle Fagaceae riunisce unicamente piante legnose dei generi *Castanea*, *Quercus*, *Fagus* e *Nothofagus* distribuiti nelle regioni temperate dell'Eurasia e delle Americhe. Il genere *Quercus* è suddivisibile in diversi sottogeneri.

Borzi (1880, 1905, 1911), suddivise le querce europee del sottogenere *Quercus* in due sezioni: *Robur* (*Lepidobalanus* Oerst.) e *Cerris* Oest.: la sezione *Robur* è caratterizzata da stili corti, ingrossati all'apice e scanalati di sopra; le squame delle cupole sono membranacee, appianate e addossate le une alle altre, inoltre la maturazione del frutto è annuale. La sezione *Cerris* presenta stili allungati, non ingrossati all'apice e non scanalati di sopra; le squame delle cupole sono più o meno lunghe e non coprentesi completamente le une con le altre; la maturazione dei frutti solitamente è biennale. Lojacono (1907, 1913-1915), successivamente, considera per il genere *Quercus* le sezioni *Robur* Endl., *Cerris* Spach., *Suber* Endl., *Coccifera* Endl. Nella monografia



dedicata alle querce d'Europa, Schwarz (1937), suddivide il genere *Quercus* in cinque sottogeneri: *Cyclobalanopsis*, *Erytrobalanus*, *Quercus*, *Cerris* e *Sclerophyllodrys*.

In seguito, G. Krüssmann (1986), propone una classificazione basata su tre sottogeneri: *Cyclobalanopsis* (con lo stesso valore tassonomico e corologico proposto da Camus), *Erytrobalanus* Oerst. e *Lepidobalanus* Endl.

Con lo sviluppo delle tecniche di analisi statistica per i dati di tipo morfologico e molecolare, ci sono state negli ultimi anni delle proposte differenti da quella di Schwarz. Nixon (1993) ha effettuato una revisione basata sull'analisi cladistica dei caratteri morfologici rifacendosi a Camus, dandone però una interpretazione strettamente filogenetica. Nixon suddivide il genere *Quercus* nei due sottogeneri *Cyclobalanopsis* e *Quercus* (= *Euquercus*), ma considera diversamente le sezioni. Inoltre suddivide il sottogenere *Quercus* in alcune sezioni: *Lobatae* (querce rosse americane), *Protobalanus* (querce del settore occidentale del continente americano, dall'Oregon al Messico) e *Quercus*, in cui vengono riunite le sezioni (*Cerris* e *Quercus*). Le analisi molecolari del DNA, effettuate da Manos *et al.* (1998), mediante il sequenziamento delle regioni ITS1 e ITS2, confermano quanto detto da Nixon, attribuendo al genere *Quercus* due soli sottogeneri: *Cyclobalanopsis* e *Quercus*. Poi, in relazione a quest'ultimo, si differenziano da Nixon riconsiderando la sez. *Cerris* autonomamente dalla sez. *Quercus*. In particolare il subgen. *Quercus* comprende le sezioni: *Lobatae* (querce rosse americane), *Protobalanus* (querce intermedie), *Quercus* (querce bianche) e *Cerris*, che comprende anche le specie sempreverdi del sottogenere *Sclerophyllodrys* (*sensu* Schwarz). La situazione tassonomica delle querce in Italia è piuttosto complessa, ma è comunque possibile attribuire le nostre caducifoglie a maturazione annuale al sottogenere *Quercus* e nel particolare al gruppo di *Q. robur* L., caratterizzato dal grande polimorfismo intraspecifico e dall'elevato grado di introgressione tra le specie. Il nome "rovere" si applica spesso a tutto il complesso delle varietà, infatti, diversi autori del passato, consideravano l'intero complesso come *Q. robur* L. per poi definire le varie sottospecie, varietà o forme. Schwarz elenca 10 specie di querce caducifoglie italiane, quali: *Q. cerris* Lin., *Q. frainetto* Ten., *Q. robur* Lin., *Q. dalechampii* Ten., *Q. congesta* Presl., *Q. pubescens* Will., *Q. virgiliana* Ten., *Q. petraea* (Matt.) Liebl., *Q. sicula* Borzì, *Q. pyrenaica* Will.

Gli autori italiani che hanno seguito le proposte di Schwarz (1964, 1993) sono Pignatti (1982) e Bernetti (1995). Pignatti (1982), in Flora d'Italia, elenca numerose specie del

genere *Quercus*: *Q. coccifera* L., *Q. calliprinos* Webb., *Q. ilex* L., *Q. suber* L., *Q. trojana* Webb., *Q. macrolepis* Kotschy, *Q. cerris* Lin. (var. *austriaca* Loud., var. *fontanesii* (Guss.) Lacaita), *Q. petraea* (Matt.) Liebl., *Q. dalechampii* Ten., *Q. robur* Lin. (subsp. *robur*; subsp. *brutia*), *Q. virgiliana* Ten., *Q. pubescens* Willd., *Q. frainetto* Ten., *Q. pyrenaica* Willd. e *Q. congesta* Presl. Bernetti (1995), in *Selvicoltura Speciale*, affronta il problema della posizione tassonomica delle querce caducifoglie della flora italiana, rifacendosi alla proposta di Schwarz. Vengono descritte, come appartenenti alla flora quercina italiana, numerose specie: *Q. robur* L., *Q. petraea* (Mattuschka) Liebl. e *Q. pubescens* Willd., ritenute le specie più importanti, ma al tempo stesso vengono elencate anche *Q. dalechampii* Ten (specie pienamente riconosciuta e censita in rilevamenti sulle due sponde dell'Adriaco), *Q. virgiliana* Ten. (rara e a ghianda commestibile), *Q. congesta* Presl (endemismo sardo e siciliano: un tipo di roverella a rami penduli), *Q. sicula* Borzi (data per dubbia nella Flora d'Italia, 1982), *Q. frainetto* Ten. (importante dal Lazio alla Calabria), *Q. pyrenaica* Willd. (specie iberica assai dubbia in Italia). Gellini & Grossoni (1997), in *Botanica Forestale*, riferendosi alla proposta tassonomica di Schwarz, elencano numerose specie, raggruppate nei diversi sottogeneri: subgen. *Sclerophyllodrys* (*Q. coccifera* L., che comprende anche *Q. caprillinos* Webb.; *Q. ilex* L. con le subsp. *ilex* e subsp. *rotundifolia* Morais); subgen. *Cerris* (*Q. cerris* L., *Q. macrolepis* Kotschy, *Q. suber* L., *Q. trojana* Webb., *Q. crenata* Lam.); subgen. *Quercus* (*Q. congesta* Presl, *Q. dalechampii* Ten., *Q. frainetto* Ten., *Q. petraea* (Matt.) Liebl., *Q. pubescens* Willd., che comprende *Q. virgiliana* Ten., *Q. pyrenaica* Willd., *Q. robur* L. con le subsp. *robur* e *brutia* (Ten) Schwarz).

## 2.5 Caratteristiche e criticità tassonomiche nelle specie indagate

La situazione tassonomica delle specie quercine risulta particolarmente controverso: vari autori indicano, in maniera discordante tra loro, numeri che variano tra 300, 500 ed oltre (Camus, 1936-54; Schwarz, 1936-39; Krussmann, 1962; Nixon, 1993).

Nello specifico, in letteratura, ne sono state descritte oltre 4000 tra specie, sottospecie, varietà e forme, molte delle quali sono poste in sinonimia o comunque non sono in uso. Anche in Italia la situazione è piuttosto complessa: secondo Pignatti (1982) la flora quercina italiana è costituita da 15 specie indigene mentre per Flora Europaea da 12. In questo paragrafo verranno affrontate le criticità tassonomiche delle specie studiate nella presente ricerca quali: *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Quercus pubescens* Willd., *Quercus frainetto* Ten..

### 2.5.1 *Q. petraea* (Matt.) Liebl.

Syn: *Q. robur* "Spielart" *Q. petraea* Mattuschka, Fl. Siles. 2: 375 (1777), nom. inval.; *Q. petraea* Linn. Liebl., Fl. Fuldensis, 403 (1784); *Q. sessilis* Ehrh., Arb. Frut. 9 : 87 (1789), nom. nud. ; *Q. sessiliflora* Salisb., Prodr. : 392 (1796) ; *Q. sessilis* Schur, Osterr. Bot. Wochenbl. 7 : 10 (1857) ; *Q. robur* L. subsp. *sessiliflora* (Salisb.) DC, Prodr. 16(2): 6 (1864).

#### Descrizione

La rovere è un albero che può raggiungere 30-40m di altezza, il tronco è robusto, diritto, cilindrico e lungamente indiviso; i rami principali sono molto nodosi e ascendenti, formano una chioma ampia, densa abbastanza regolare; le foglie sono caduche, un poco coriacee allo stato adulto, intensamente verdi e glabre sulla pagina superiore, glabrescenti o più o meno pubescenti e glaucescenti su quella inferiore (in tutti i casi con ciuffi di peli rossastri all'ascella delle nervature), hanno forma oblunگو-obovata con la massima larghezza verso la metà; sono cuneate o talora troncate-cordate alla base, con lobi (5-8) arrotondati, meno profondi e più regolari che nella farnia mentre la lunghezza della foglia è simile; invece il picciolo è caratteristicamente lungo (1,5-3 cm). Il frutto maturante nell'anno e portato da un peduncolo pubescente quasi inesistente o brevissimo (da qui i sinonimi *Q. sessilis* e *Q. sessiliflora*). La cupola è formata da squame pubescenti, ovato-lanceolate, strettamente appressate per cui la superficie appare omogenea e liscia, la ghianda appetita dai suini è di dimensioni leggermente inferiori rispetto alla farnia. La rovere ha un areale incluso in quello della farnia, con limitazioni soprattutto in senso continentale in quanto risulta molto suscettibile alle gelate tardive (entra in vegetazione prima della farnia). Essa risente meno dei danni da siccità essendo provvista di un apparato radicale fittonante e profondo, ma non tollera la sommersione; è relativamente esigente, ottimali sono i suoli acidi o sub-acidi ben drenati, è eliofila anche se i semenzali possono sopportare un ombreggiamento continuato per 2-3 anni. In Italia la diffusione della rovere (fig. 2.5) ha risentito molto delle trasformazioni in colture agrarie, della coltura del castagno, e dell'intenso sfruttamento che ha subito nei secoli. *Q. petraea* è distribuita su tutto il territorio italiano, ad eccezione della Sardegna e solo recentemente è stata descritta da Brullo *et al.* (1999) una nuova sottospecie tipica della Sicilia e di parte della Calabria. Si tratta della sottospecie *austrotyrrhenica* Brullo, Guarino & Siracusa (1999), che occupa le stazioni più meridionali dell'areale della specie e che rappresenta un esempio di vicarianza geografica con la sottospecie

*huguentiana* Franco & Lopez, che invece si localizza l limite occidentale dell'areale. E' una specie mesofila, predilige un clima temperato umido, ma non sopporta il ristagno prolungato dell'acqua nel suolo; è legata preferenzialmente ai suoli acidi, sciolti e profondi.

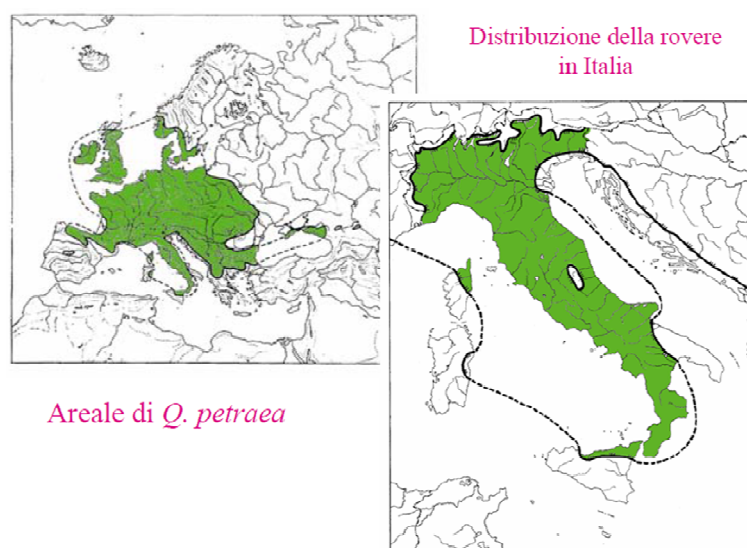


Fig. 2.5. Areale di distribuzione di *Q. petraea*. <http://www.museobotanico.unian.it/>

#### *Criticità tassonomiche*

La rovere presenta una situazione tassonomica piuttosto complessa: ne sono state descritte numerose forme e numerose sono le sinonimie che la interessano. Per la Penisola italiana i numerosi autori che si sono occupati di querce, mostrano un comune accordo nel descrivere la rovere, e tuttavia le varietà descritte sono molto ridotte rispetto a quanto osservato da Camus. Tenore indica per la rovere due varietà sotto il nome *Q. robur* Will. La var. *nobilis* risulta caratterizzata da foglie di colore verde pallido, subpicciolate, con contorno obovato, base cordata e leggermente lobata, apice e lobi rotodi subdentato-subondulati; frutti ovati, sessili e solitari di max. diam. 10-12 lin. La var. *conglomerata*, si distingue per l'autore dalle foglie ellittiche più o meno lungamente picciolate, leggermente situato-lobate, apice e lobi rotondi sub-interi e frutti aggregati. Poco dopo, Bertoloni (1854) descrive questa specie come *Q. Escolus*, e la caratterizza per le foglie sinuato-lobate e per la pubescenza dovuta a peli stellati; in questa specie lo stesso Bertoloni inserisce anche *Q. virgiliana* Ten. Borzì (1911) si riferisce alla rovere col binomio di *Q. sessiliflora* Salisb. e ne considera le varietà: a. *parvifolia* Bér.; b. *sublobata* Bér.; c. *lobatissima* Bér.; d. *crispata* Bér.; e. *macrophylla* Bér. Inoltre lo stesso Borzì, considera *Q. virgiliana* Ten. particolarmente affine alla rovere, anche se con una maggiore autonomia rispetto alle varietà prima viste, descrivendone la var.

*purpurea* Borzi, caratterizzata da rami e foglie giovani di colore rosso, varietà molto rara in Sicilia. Anche Fiori (1923) descrive per l'Italia più varietà attribuibili alla rovere; oltre alla var. *sessilis* Ehrh., rappresentante la forma tipica e più comune, descrive la var. *aurea* Wierzb, che si caratterizza principalmente per i lobi profondamente incisi e per le nervature giallastre, questa varietà sarebbe presente in Italia nord orientale.

Altra varietà considerata da Fiori e attribuibile alla rovere è la var. *decipiens* Bechst., caratterizzata dalla base cuneata e ristretta al picciolo, tipica del triestino. Recentemente la situazione italiana (Pignatti, 1982) appare semplificata e viene riportata la sola *Q. petraea* (Matt.) Liebl., senza alcun riferimento a sottospecie o varietà. Anche Schwarz (1996) per l'Italia indica la sola *Q. petraea*, ma definisce comunque un certo numero di specie affini a questa, distribuite in varie aree dell'Europa, quali: *Q. mas* Thore, distribuita in Francia e Spagna; *Q. polycarpa* Schur, dalla penisola Balcanica fino alla Turchia; *Q. dalechampii* Ten., dall'Italia all'Ungheria; *Q. hartwissiana* Steven, tipica della parte più orientale della Bulgaria, della Turchia, fino al Nord dell'Anatolia e ad occidente del Caucaso.

### **2.5.2 *Q. pubescens* Willd.**

Syn. : *Q. humilis* Miller, Gard. Dict. ed 8, n° 4 (1768) *nom. rej. prop.*; *Q. lanuginosa* Lamk., Fl. Franc., ed. 1, ii. 209 (1779); *Q. robur* L. var. *lanuginosa* Lam. Encycl. Méth. Bot. 1: 717 (1785); *Q. lanuginosa* Thuill, Fl. Par. ed. II. 502. (1790); *Q. sessiliflora* Salisb. var. *pubescens* (Willd.) Loud., Arb. Brit. 3: 1736 (1838); *Q. robur* L. subsp. *sessiliflora* (Salisb.) DC. var. *lanuginosa* (Lam.) DC., Prodr. 16(2): 10 (1864); *Q. sessiliflora* Salisb. subsp. *lanuginosa* (Lam.) Celak., Prodr. Fl. Böhm. 2: 131 (1871); *Q. pubescens* Will. subsp. *lanuginosa* (Lam.) Schwarz O., Feddes Repert. 33:335 (1934); *Q. humilis* Miller subsp. *lanuginosa* (Lam.) Franco & G. Lopez, Anales Jard. Bot. Madrid 44: 557 (1987).

#### *Descrizione*

La roverella fra le diverse specie europee del sottogenere *Quercus* è sicuramente la più polimorfa e quindi risultano ancora più accentuati i problemi di inquadramento tassonomico. È un albero di taglia inferiore a *Q. petraea* e raramente raggiunge i 25 m di altezza, il fusto è breve, non particolarmente diritto, con branche sinuose e rami sottili e divergenti che vanno a formare una chioma ampia, irregolare, non molto densa. Le foglie sono semplici, alterne, con lamina di forma fittamente pubescente. Il picciolo è lungo 0,5-1,5, tomentoso. E' una specie che può iniziare a fruttificare molto

precocemente (10-12 anni). I frutti, maturanti nell'anno, sono portati su un breve peduncolo pubescente. La ghianda è protetta anche sino a metà da una cupola munita di squame grigiastre, molto pubescenti, appressate, triangolari, appressate anche all'apice e superanti il bordo della cupola. L'areale della roverella (fig. 2.6) gravita principalmente nella parte meridionale del continente europeo, in Italia si ritrova in tutte le regioni fra 200 e 800 m s.l.m. prevalentemente su pendii caldi e luminosi. La roverella è tipica specie eliofila, termofila e xerofila, nell'area mediterranea tende ad sottrarsi l'aridità estiva sfruttando il suo apparato radicale fittonante, profondo ed espanso. E' adattata a temperature elevate ma sopporta anche inverni abbastanza freddi; si tratta di una specie frugale e indifferente al tipo di suolo; si afferma anche su terreni poco profondi e su versanti caldo-aridi, dove costituisce boschi puri.

Ha un periodo di fioritura e l'entrata in vegetazione più precoci del leccio, con l'emissione di getti autunnali e con accenni di comportamento da semisempreverde. Grazie a questi adattamenti, la roverella è in grado di competere con il leccio almeno nelle regioni ancora sufficientemente piovose. Ha crescita relativamente lenta (questo la espone all'azione di specie concorrenti) e notevole capacità pollonifera; viene tenuta per lo più a ceduo per produrre legna da ardere.

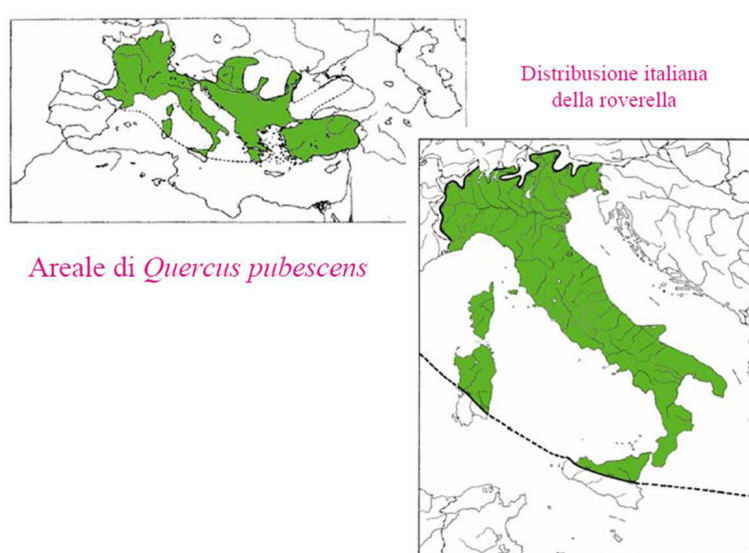


Fig. 2.6. Areale di distribuzione di *Q. pubescens*. <http://www.museobotanico.unian.it/>

#### *Criticità tassonomiche*

Questa specie rappresenta per diversi autori il capostipite di un complesso di specie, sottospecie, varietà e forme che sono raggruppate sotto il nome di *lanuginosae*. Solitamente, a causa delle incertezze esistenti sul reale stato tassonomico di queste cosiddette "specie" e per le difficoltà nel determinarle, i botanici tendono ad indicarle

tutte sotto il nome di *Q. pubescens* s. l. Notevoli sono le problematiche nomenclaturali e tassonomiche della roverella. Viene comunemente riportata come *Q. pubescens* Will. o *Q. lanuginosa* Lam. (Camus, 1935-36; Schwarz, 1937; Jalas & Suominen, 1976; Hedge & Yaltirich, 1982; Greuter *et al.*, 1986; SCHWARZ, 1993) ma, in ordine temporale, il binomio specifico *Q. humilis* Miller è stato il primo proposto per questa specie; Il binomio *Q. pubescens* Will., è stato utilizzato per la prima volta da Willdenow nel 1796 (Berl. Baumz.: 279). Nonostante i diversi nomi con cui è stata descritta, l'idea comune dei botanici è che si trattasse di una specie caratterizzata da foglie pubescenti, con base cordata e asimmetrica, ghiande con cupole costituite da squame subeguali. Tuttavia gli autori delle flore dei diversi paesi europei sono in accordo con i caratteri morfologici più evidenti, ma molti considerano delle sottospecie, varietà e forme per i propri ambiti geografici. Seguendo il gradiente geografico, che da occidente porta all'est europeo, osserviamo come viene interpretata *Q. pubescens* dai vari autori, al fine di verificare se vi è una reale idea comune per questa specie ad un livello geografico più ampio. Amaral Franco (1990), descrive *Q. humilis* Miller come un *taxon* particolarmente polimorfo a causa dell'ibridazione che ne intercorre con *Q. faginea* Lam. Coste (1906) sotto il binomio di *Q. pubescens* Will. descrive una quercia con rami e foglie tomentosi, queste ultime dal contorno obovale, da sinuato-lobate a pinnatifide, i frutti sono di forma ovoidi. Inoltre dall'iconografia proposta si osserva chiaramente che le foglie hanno base cordata e che le squame della cupola sono piane e lanceolate, la cupola ricopre circa 1/3 della ghianda. Camus (1935-36), la descrive come *Q. lanuginosa* Lamk. e ne fa una dettagliatissima descrizione, inoltre distingue la subsp. *eu-lanuginosa* A. Camus, la subsp. *palensis* A. Camus (= *Q. pubescens* subsp. *palensis* Schwarz), la subsp. *brachyphylla* A. Camu (= *Q. brachyphylla* Kotschy), la subsp. *edwediewii* A. Camus (= *Q. sessiliflora* var. *pinnatifida* Medwediew), la subsp. *Dalechampii* A. Camus (= *Q. dalechampii* Ten.) e la subsp. *crispata* A. Camus (= *Q. crispata* Steven). Per la sottospecie *eu-lanuginosa*, che rappresenta la forma tipica della specie, definisce dei caratteri morfologici importanti, come il colore grigio-bruno della corteccia caratterizzata da fessure longitudinali con dense squame abbastanza piccole. Rami densamente tomentosi di colore grigio-bruno, con foglie tardivamente caduche di 4-6,5 x 8-12 cm, largamente obovali, sinuoso-lobate e solo raramente pinnatifide, con apice ottuso e arrotondato, raramente la base è attenuata o cuneiforme; picciolo lungo 1-1,5 cm, raramente 2. Per quel che riguarda i frutti, per Camus le cupole, di 1,4-2 cm di

diam. e 1-1,5 cm di lunghezza, sono subemisferiche, avvolte ciaziformi, coprenti appena 1/3 della ghianda e solo a volte più della metà; le squame sono molto numerose, appressate, tomentose, triangolari, di colore grigio chiaro, eccetto l'apice che è marrone, queste sono regolarmente decrescenti verso l'apice, che supera il bordo della cupola. Le ghiande vengono descritte di forma ovoidale o subellittica, bruno chiare con striature longitudinali, glabre, di 2,5-3 cm di lunghezza e 1,5-2 cm di diametro, raramente più grandi. Camus considera insito in *Q. lanuginosa* Lam. subsp. *eu-lanuginosa* un complesso di varietà che si diversificano per i caratteri di foglie e frutti. Per quel che riguarda la parte centrale dell'areale di distribuzione della specie, e in particolare del territorio centro europeo, può essere presa in considerazione la sintesi di Schwartz (1964, 1996) per *Flora Europaea*, infatti l'autore, che ha avuto modo di studiare esemplari di tutta Europa, ebbe molto da dire sui saggi raccolti in Europa centrale (Francia, Germania, Austria). La descrizione di Schwarz per *Q. pubescens* Will. riporta: rami densamente tomentosi o pubescenti; foglie di 4-12(-16) cm, da sinuate a pinnatifide, densamente tomentose di sotto; picciolo di 12-15 cm. Frutti subsessili o brevemente pedunculati; cupola di 15(-20) x 14 mm; squame lanceolate, pubescenti, appressate. L'autore riconosce inoltre tre sottospecie: subsp. *pubescens*, diffusa in tutto l'areale della specie ad esclusione dei Pirenei; subsp. *anatolica* O. Schwarz, propria dell'est dei balcani e della Crimea: subsp. *palensis* (Palassou) O. Schwarz, esclusiva dei Pirenei e del nord-ovest della Spagna. Per l'area balcanica Christensen (1997) considera la sola *Q. pubescens* Will. (1805), e tutte le forme di *lanuginosae*, quali *Q. virgiliana* Ten., *Q. crispata* Steven, *Q. brachyphylla* Kotschy, vengono messe in sinonimia con essa. Savulescu (1952, per l'est Europeo,) descrive chiaramente *Q. pubescens* Will., differenziandola bene dalle specie affini, quali *Q. virgiliana* Ten. anch'essa presente nell'est Europa. In particolare Savulescu, descrive più varietà, le quali presentano caratteristiche simili dei frutti, quali il contorno regolare della cupola, ricoprente circa 1/3 della ghianda, e le squame piane e lanceolate. Le varietà descritte dall'autore si differenziano però dalle foglie; infatti nella var. *lanuginosa* (Lam.) Tenore (1811-38), nel territorio italiano, riconosce *Q. pubescens* Will. (1805) e la indica come frequente nelle province settentrionali del Regno di Napoli (Abruzzo, Gargano, Cilento, ecc). La specie è per Tenore caratterizzata da foglie ovato-oblunghe, dal contorno sinuato, pubescenti di sotto e con base subcordata; i frutti sono di piccole dimensioni. Gussone (1844), in accordo con Tenore, riporta che le foglie giovani sono tomentose su



entrambi i lati, le adulte sono pubescenti di sotto e glabrate di sopra, dal contorno obovato e base subcordata, ottusa; la lamina è sinuato-lobata per lobi brevi e integri o subdentato-crenati. I frutti immaturi sono riuniti in un complesso definito glomerato-racemoso, mentre quelli maturi sono pochi e sessili, con ghiande oblunگو-obovate, due volte più lunghe della cupola. I rami, particolarmente quelli giovani, sono distorti e corti, cinereo-villoso-lanati; le foglie sono persistenti fino alla nascita delle nuove foglie. Anche Bertoloni (1854) la descrive con notevole accordo a Tenore, e considera diagnostici i caratteri fogliari della pubescenza della foglie e del ramo, la base cordata e i frutti piccoli. Borzi (1880, 1905, 1911) la riporta come un alberello o un arbusto con rami tomentosi; foglie di media dimensione, sparsamente pelose di sopra e tomentose di sotto, lungamente picciolate (1/4, 1/6 della lamina), il margine fogliare è sinuato-lobato, per lobi regolari, ottusi o acuti; frutti sessili. Ad indicare il polimorfismo di questa specie, Borzi ne indica ben tredici varietà: var. *microphylla* Brzi., var. *Gasparrini* Brzi., var. *Nicotrae* Brzi., var. *laciniosa* Brzi., var. *macrophylla* Brzi., var. *pinnatifida* Brzi., var. *macrophylla* Brzi., var. *Todaroana* Brzi., var. *glabrescens* Brzi., var. *microbalana* Brzi., var. *Proteus* Brzi., var. *brachyphylla* Kotschy, var. *crenata* Brzi. e var. *purpurascens* Brzi. Fiori (1923) considera la roverella una delle tante varietà di *Q. robur* L. e la differenzia dalle altre per le foglie di medio-piccole dimensioni, dal contorno sinuato-lobato, grigio tomentose di sotto, a picciolo lungo 5-18 mm. Lo stesso (1930b) indica per la roverella delle ghiande di piccole dimensioni e nella iconografia si osserva che la cupola, ricoprente circa 1/3 della ghianda, è costituita da squame piane, lanceolate e appressate. Pignatti (1982), nell'ultima *Flora d'Italia*, descrive *Q. pubescens* come la specie più comune in Italia, tra le lanuginose. La specie viene descritta con rami tomentosi; le foglie sono bianco-tomentose di sotto (alla fine glabrescenti); la lamina è oblanceolata (4-8 x 5-10 cm) con 4-6 lobi per lato, profondamente incisi, picciolo di 6-13 cm; frutti sessili, raramente su breve peduncolo. Infine Brullo *et al.* (1999), descrivono dettagliatamente *Q. pubescens* riportando importanti caratteri della corteccia, la quale risulta leggermente fessurata longitudinalmente, divisa in piccole scaglie allungate e poco rilevate (in accordo con quanto riportato da Camus l. c.), i rami giovani sono densamente tomentosi, di colore bruno-grigi. Il lembo fogliare è obovato (8-12 x 4-6,5 cm), da cuneato a cordato alla base; la pagina inferiore è tomentoso-lanosa, presentante 5-8 lobi, da arrotondati a mucronati, separati da incisioni poco profonde. Per i frutti Brullo *et al.* (l. c.) riportano

che sono sessili, raggruppati in 1-3(4) su asse fruttifero di 3-30 mm; la cupola (diam. 1,4-2 cm) ricopre generalmente 1/4-1/2 della ghianda, ed ha forma da subemisferica a ciaziforme, con bordo regolare e squame triangolari, appressate, piane, tomentose.

### 2.5.3 *Q. frainetto* Ten.

*Syn.*: *Quercus conferta* Kit. in Schult. Oesterr. Fl. ed. II. i. 619 (1814); *Quercus hungarica* Hubeny in Rössl. Gemein. Bl. 20 (1830); *Quercus stingosa* Wierzb. in Roch. Reise Banat (1838); *Quercus spectabilis* Kit. ap. Simk. in MNL 73 (1883); *Quercus rumelica* Griseb. & Schenk in Wieg. Archiv, xviii 353 (1852).

#### *Descrizione*

Il binomio specifico del farnetto (o quercia d'Ungheria) deriva da un refuso tipografico in quanto Tenore nel 1813 aveva chiamato questa specie *Q. farnetto*, in riferimento al nome comune, e non "frainetto" come compose invece il tipografo. E' un albero alto fino a 30-40 m, ha portamento slanciato maestoso, che ricorda quello della rovere, con chioma ampia e densa. Le foglie ricordano quelle della farnia, ma sono di maggiori dimensioni, molto più profondamente lobate e muniti di peli fulvi sulla pagina inferiore. Tenore (1811-1838) osserva che questa quercia è affine a *Q. pyrenaica* Will., da cui differisce perché priva di tomento nella faccia superiore delle foglie e con lacinie tondeggianti. Le ghiande sono portati da peduncoli quasi nulli o molto corti, protetta da una cupola con squame numerose, pubescenti e appressate, sporgenti dal margine della cupola. L'areale del farnetto (fig. 2.7) è essenzialmente europeo sud-orientale, l'area italiana va dal sud della Toscana fino alla Calabria, in particolare è presente nella Maremma meridionale, è molto diffuso in Lazio, Molise e Campania; in Puglia è presente nelle selve del Gargano e arriva fino alla Calabria. Vi sono anche delle segnalazioni per la Sicilia, ma in realtà pare che si sia estinta. E' una specie mesofila, legata ad un clima di tipo sub-mediterraneo, ed è particolarmente legato a substrati silicei o decalcificati, debolmente acidi. Il farnetto è una specie esigente in fertilità e scioltezza del suolo, è piuttosto eliofila ma in gioventù sopporta l'ombra meglio della rovere e della farnia inoltre ha straordinaria rapidità di accrescimento che manifesta soprattutto quando viene tenuta a ceduo.

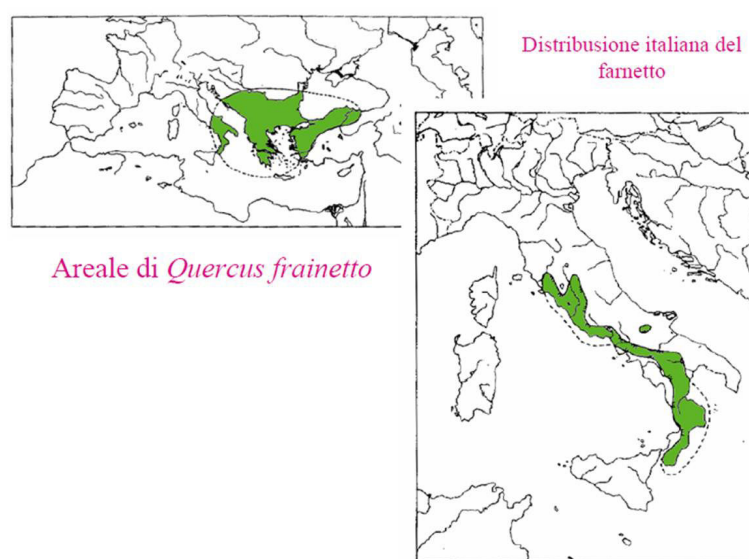


Fig. 2.7. Areale di distribuzione di *Q. frainetto*. <http://www.museobotanico.unian.it/>

#### Criticità tassonomiche

*Q. frainetto* è la meno problematica dal punto di vista tassonomico, i principali autori che si sono occupati del genere *Quercus*, inseriscono questa specie nel sottogenere *Quercus*, ma al tempo stesso la separano dalle altre specie sopra studiate a diversi ranghi tassonomici. Camus la separa dalle altre a livello di sezione, inserendola insieme a *Q. pyrenaica* e *Q. bioniana* nella sez. *Mesobalanus*, subsect. *Macrantherae*; ricordiamo che le altre specie considerate sono raggruppate da Camus nella sez. *Lepidobalanus*. Schwarz invece la inserisce nella sez. *Dascia* e subsez. *Esculus*, le stesse delle querce lanuginose (Ser. *Lanuginosae*), e la separa da queste a livello di serie, inserendola appunto nella serie *Confertae*, insieme a *Q. pyrenaica*. La gran parte degli autori italiani ha visto in questa specie un'entità chiara e inconfondibile con le altre querce, tanto che molti non hanno sentito la necessità di differenziarne delle varietà o forme. Al contrario alcuni hanno comunque visto una certa variabilità della specie, tale da doverne definire delle varietà. Tra questi Borzì (1880-1911), il quale descrisse le varietà (a.) *minor*, (b.) *sublobata* e (c.) *cerroides*. Fiori (1930b) afferma che le foglie del farnetto si avvicinano a quelle della farnia, per la brevità del picciolo, le orecchiette basali e per essere slargate nel terzo superiore; sono però più profondamente lobate e munite di peli fulvi nella pagina inferiore. Le stipole persistono sino all'autunno. I ramoscelli sono mollemente pelosi, i frutti sono simili a quelli di *Q. lanuginosa*, cioè sessili o quasi, ma con cupole a squame superiori libere e sporgenti dal margine della cupola stessa. Pignatti (1982), si rifà a Fiori (1923, 1930b) nella descrizione del farnetto e per la sua differenziazione, inoltre riprende l'iconografia dello stesso Fiori (1933). In ambito

europeo, le descrizioni delle varie flore dell'est sono tutte in comune in accordo sui caratteri che permettono la discriminazione di questa specie. Infatti, Schwarz (1937, 1964, 1993), Savulescu (1952), Hedge & Yaltirik (1982), Christensen (1997), la caratterizzano per i rami giovani tomentosi, le stipole persistenti, le foglie di grandi dimensioni, obovate, con orecchiette alla base, profondamente pinnatifide con 7-9 paia di lobi, spesso lobati, pubescenti di sotto, picciolo 2-6 mm; cupola con squame oblunghe, ottuse, pubescenti, piane e libere. La specie in esame non presenta alcuna sorta di problematicità tassonomica e risulta morfologicamente ben definita, da ciò è chiaro che la variabilità descritta per il farnetto è essenzialmente legata alla morfologia fogliare e non si osservano varietà o forme relative ai caratteri fruttiferi.

## **2.6 I querceti dell'Italia centro meridionale**

I querceti costituiti dalle specie del sottogenere *Quercus* sono diffusi in tutt'Italia e rappresentano le comunità forestali dominanti dalla fascia mediterranea fino a quella sub-montana. In particolare queste comunità possono essere caratterizzate dalla presenza di una o più di queste specie, le quali possono essere più o meno dominanti in funzione delle caratteristiche pedo-climatiche del territorio.

### **2.6.1 Molise**

La regione Molise si caratterizza per una notevole eterogeneità territoriale. Da un punto di vista geografico, la sua posizione centrale nella penisola comporta la sovrapposizione tra cenosi con baricentro nell'Italia centro-settentrionale e comunità a distribuzione centrata nell'Italia centro-meridionale (Paura *et al.*, 2010). Nel territorio molisano si verifica dunque la coesistenza delle due biocore mediterranea e temperata, accompagnate da un incontro di *taxa* e cenosi di volta in volta al limite meridionale o settentrionale del proprio areale; in corrispondenza dei rilievi collinari argillosi, calcarei e marnosi della regione bioclimatica mediterranea, ma anche sui rilievi calcarei della valle del Volturno, è presente il bosco misto dominato dalla roverella che coincide anche con le aree più intensamente sfruttate (Paura *et al.*, 2010). Procedendo verso l'interno, passando dalla regione bioclimatica mediterranea a quella temperata, il bosco a dominanza di roverella cede il posto al querceto misto di roverella e cerro, ovvero la formazione potenzialmente più diffusa del territorio molisano. Studi fitosociologici effettuati in Molise hanno censito le seguenti cenosi vegetali a dominanza di querce: querceti a caducifoglie dell'alleanza *Ostryo-Carpinion orientalis*, con le associazioni *Roso sempervirentis-Quercetum pubescentis* (querceti a dominanza di roverella) e

*Melittio-Ostryetum carpinifoliae* (ostrieti); dell'alleanza *Teucrio siculi-Quercion cerridis*, con l'associazione *Echinopo siculi-Quercetum frainetto* (querceti planiziali e subcollinari a cerro e farnetto); suballeanza *Laburno- Ostryenion* con l'associazione *Daphno laureolae- Quercetum cerridis* (quercetimesofili a cerro e roverella).

In Molise la roverella è dunque una specie comune in tutto il territorio dove forma boschi puri, in condizioni termofile, oppure si associa a cerro, farnetto e rovere in condizioni di mesofilia. Il farnetto rappresenta un importante elemento dei boschi mediterranei di fondovalle in consociazione con il cerro mentre nelle aree sub-mesofile e forma boschi misti con cerro, rovere e roverella. Anche la rovere è presente in questa regione in maniera diffusa e forma boschi mesofili solitamente in consociazione con il cerro e il farnetto. Queste tre specie hanno differenti ecologie, prediligendo condizioni ambientali particolarmente differenti. Spesso vivono in consociazione, come è stato evidenziato per l'area studio del bosco di Monte Vairano (CB), ma questi casi sono particolarmente rari in Italia centro-meridionale e rappresentano un esempio di particolare rilevanza. Per quanto riguarda l'area studio del bosco misto di Monte Vairano (997 metri s.l.m), questo è situato in un Sito di Importanza Comunitaria (SIC Monte Vairano), inserito nella rete Natura 2000 della Direttiva Habitat 92/43 CEE. Questo sito SIC è caratterizzato da una vegetazione con una spiccata diversità biologica ed un buon livello di conservazione di ecosistemi ed habitat. L'elemento dominante e tipico di questa area è rappresentato dalle foreste, che ricoprono quasi completamente i versanti. L'area di Monte Vairano rientra nella fascia fitoclimatica del *Castanetum* della sottozona fredda del secondo tipo, che si estende nelle fasce altitudinali maggiori. La vegetazione spontanea, tipica delle aree collinari e della fascia submontana, è rappresentata dal castagno e dalle querce caducifoglie. Le specie arboree che disegnano la fisionomia del bosco di Monte Vairano sono *Quercus cerris*, *Quercus frainetto* e *Quercus pubescens*. A queste specie si accompagnano di frequente, sebbene in modo secondario, *Acer opalus* Mill. subsp. *obtusatum* Gams., *Acer campestre* L. *Fraxinus ornus* e, più sporadicamente, *Ostrya carpinifolia* Scop.). Poiché tali boschi sono assoggettati a ceduzione, l'altezza dello strato arboreo non supera i 14-16 metri. Le centenarie pratiche di taglio, gli incendi e il pascolo hanno infatti profondamente alterato l'originaria fisionomia e la composizione floristica di questi boschi, determinando un forte ostacolo all'affermarsi delle condizioni migliori per un bosco maturo e stabile. Un elemento arboreo di pregio è rappresentato da *Quercus crenata*

Lam., una quercia dalla posizione tassonomica abbastanza controversa, da alcuni ritenuta una specie autentica, da altri considerata un ibrido tra cerro e sughera (*Quercus suber* L.). Sebbene per l'Italia esistano diverse segnalazioni, va sottolineato che la presenza di questa quercia è da ritenersi sporadica e pertanto considerata come specie rara. L'area è caratterizzata dalla presenza dell'habitat comunitario 91M0 ("Foreste pannonico-balcaniche di cerro e rovere"), costituito da estese foreste termofile e mesofile a dominanza di *Quercus cerris*, *Quercus pubescens* e *Quercus petraea*, localmente sostituite da fustaie e cedui di *Quercus frainetto*. (MATTM, Formulario Standard Natura 2000 - agg. 07/2008).

### **2.6.2.Lazio**

L'attuale assetto della componente vegetazionale è il risultato dell'interazione di fattori ecologici, biogeografici e storici. Sotto il profilo ecologico, l'articolata fisiografia della regione e la presenza di catene montuose prossime al mare generano una grande varietà di tipi climatici e una forte compenetrazione fra la regione temperata e quella mediterranea (Blasi *et al.*, 2010). Per quanto riguarda il settore centro-meridionale, geograficamente è distinto in unità appenninica, unità sub-appenninica e unità anti-appenninica costiera. L'unità appenninica comprende i principali complessi montuosi della regione (Monti Reatini, Monti della Laga, settore occidentale della catena del Monte Velino, Simbruini-Ernici, Monti della Meta e Mainarde) ed è caratterizzata soprattutto da faggete e da boschi mesofili a carattere suboceanico, quali ostrieti e cerrete, o da roverelleti di tipo subcontinentale (Blasi *et al.*, 2010). L'unità sub-appenninica consta di una serie di rilievi di modesta altitudine (1000-1600 metri), quali Sabini, Ruffi, Lucretili, Prenestini, Affilani, Colli Albani, Monte Cairo, disposti lungo una direttrice orientata NW – SE, al margine orientale delle valli dei fiumi Tevere, Sacco e Aniene (Blasi *et al.*, 2010). I boschi si presentano molto eterogenei per flora e struttura: su substrati calcarei prevalgono gli ostrieti, i roverelleti e le leccete, mentre in ambiti edafici caratterizzati da una maggiore umidità sono presenti cerrete e castagneti (Blasi *et al.*, 2010). L'unità anti-appenninica costiera è costituita dai rilievi carbonatici che si affacciano sulla costa tirrenica del Lazio meridionale e coincide sostanzialmente con la catena dei Volsci (Lepini, Ausoni e Aurunci), alla quale si associa il meno esteso, ma di grande importanza biogeografica, promontorio del Circeo, anche in questo comprensorio i boschi sono piuttosto eterogenei e vanno dalla lecceta al bosco misto (Blasi *et al.*, 2010). I versanti e le valli interne dei Monti Simbruini e dei Monti Ernici

sono caratterizzati dalla serie appenninica centrale neutro-basifila della roverella (*Cytisus sessilifolius-Quercus pubescens* sigmetum, Blasi *et al.*, 2010). Questa tipologia forestale non è molto comune nel territorio laziale, in quanto caratteristica di bioclimi subcontinentali. È infatti distribuita in un range altitudinale compreso tra 400 e 1200 metri e su versanti dei rilievi carbonatici. Si tratta di boschi di roverella piuttosto aperti, caratterizzati da una notevole ingressione di specie arbustive (*Cytisophyllum sessilifolium*, *Spartium junceum*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Chamaecytisus spinescens*) ed erbacee provenienti dagli xerobrometi (*Bromus erectus* subsp. *erectus*, *Koeleria lobata*, *Phleum hirsutum* subsp. *ambiguum*); normalmente si tratta di boschi cedui con turni di taglio piuttosto ravvicinati (Blasi *et al.*, 2010). I versanti a debole pendenza dei rilievi collinari carbonatici o calcareo-marnosi e le morfologie di pedemonte alla base della catena dei Lepini-Ausoni-Aurunci sono caratterizzati dalla serie preappenninica neutro-basifila della roverella (*Rosa sempervirens-Quercus pubescens* sigmetum). Fisionomicamente si tratta di boschi di roverella con sottobosco di arbusti mediterranei sempreverdi. Si tratta spesso di boschi cedui a copertura discontinua. Nello strato arboreo possono essere presenti, accanto a *Quercus pubescens* subsp. *pubescens*, altre specie termofile come *Q. ilex* subsp. *ilex*, *Acer monspessulanum* subsp. *monspessulanum*, *Cercis siliquastrum* subsp. *siliquastrum* (Blasi *et al.*, 2010).

### 2.6.3 Puglia

L'ambiente boschivo pugliese è influenzato da diversi fattori che ne hanno caratterizzato la composizione floristica: fattori come i fenomeni paleogeografici e l'antropizzazione hanno agito in particolare sulla sua fisionomia, incidendo sia la flora che la vegetazione naturale originaria. Sulla base di peculiari caratteristiche ambientali e antropiche la Puglia può essere idealmente suddivisa in diverse subregioni quali: il Gargano, il Subappennino Dauno, il Tavoliere di Foggia, la Murgia Alta, la Cimosà Litoranea, la Murgia di Sud Est o Murgia dei Trulli, l'Anfiteatro Tarantino, il Tavoliere di Lecce, il Salento delle Serre o Salento meridionale (Biondi *et al.*, 2010). Il Gargano è la subregione pugliese con la più cospicua presenza di aree boschive. Lungo la fascia costiera esposta a sud-est prevalgono le pinete spontanee a *Pinus halepensis*, come nel tratto Mattinata-Vieste. Procedendo verso l'entroterra e salendo di quota sono maggiormente presenti le formazioni a leccio. A quote maggiori dominano le cerrete e nella parte più interna le faggete, con il nucleo più ampio presente nella Foresta Umbra. Nel tratto settentrionale della costa garganica la duna di Lesina ospita una importante

vegetazione di macchia mediterranea. Il settore collinare della Puglia settentrionale a confine con il Molise e le pendici settentrionali del Subappennino Dauno sono caratterizzate dalla serie preappenninica neutro-basifila della roverella (*Rosa sempervirentis-Quercus pubescentis sigmetum*). Fisiograficamente, questa serie è caratterizzata da boschi a dominanza di roverella, con orniello, acero minore e talvolta leccio nello strato arboreo (Biondi *et al.*, 2010). Il Subappennino Dauno è una sub-regione ricca di aree boschive, con netta prevalenza di formazioni di cerro e di roverella governate a ceduo, mentre le faggete risultano sporadiche e relitte. Molto estese sono le aree a pascolo con formazioni erbacee e arbustive. Sui versanti orientali e sud-occidentali del Gargano e nei settori più caldi del Subappennino Dauno è presente la serie garganica calcicola della quercia virgiliana (*Cyclamino hederifolii-Quercus virgilianae sigmetum*). Questa serie si sviluppa su substrati calcarei con suoli mediamente profondi, del tipo delle terre rosse, in bioclima mesotemperato della variante sub mediterranea. I boschi maturi di questa serie sono rappresentati da un bosco termomesofilo che occupa i versanti poco acclivi, esposti prevalentemente a settentrione. Si tratta di un bosco ceduo matricinato, nella cui composizione arborea rientrano talvolta *Fraxinus ornus*, *Quercus dalechampii*, *Q. ilex*, *Carpinus orientalis* e *Ostrya carpinifolia* (Biondi *et al.*, 2010). Il Tavoliere di Foggia costituisce un'ampia pianura che separa il Subappennino Dauno dal Gargano. I boschi Incoronata e Dragonara sono quanto oggi resta della vegetazione forestale del Tavoliere. Si tratta di formazioni a *Quercus virgiliana*, nella cui serie di ricostituzione partecipano arbusteti a *Cercis siliquastrum* e *Paliurus spina-christi*. Nel tavoliere foggiano, nelle pianure e fondivalle del versante settentrionale del Gargano è presente la serie del tavoliere foggiano neutrobasifila della quercia virgiliana (*Irido collinae-Quercus virgilianae sigmetum*). Questi boschi sono caratterizzati da boschi cedui invecchiati a carattere termo-mesofilo, con grandi esemplari secolari di *Quercus virgiliana* e taluni di *Quercus amplifolia*. Nello strato arboreo sono presenti anche *Quercus dalechampii* e *Ulmus minor* (Biondi *et al.*, 2010). La Murgia Alta è rappresentata da un ampio tavolato calcareo caratterizzato da un substrato calcareo affiorante sul quale si sviluppa una vegetazione erbacea substeppica di origine secondaria. I pochi lembi boschivi residui sono rappresentati da querce caducifoglie del gruppo della roverella, come *Quercus dalechampii*, *Q. virgiliana* e *Q. amplifolia* (Biondi *et al.*, 2010). Sulle Murge calcaree nord-occidentali si sviluppa infatti la serie dell'Alta Murgia neutrobasifila della quercia



di Dalechamps (*Stipo bromoidis-Quercus dalechampii sigmetum*): è un bosco a dominanza di *Quercus dalechampii*, con *Q. virgiliana* e *Q. pubescens* nello strato arboreo (Biondi *et al.*, 2010). Attualmente i boschi di questa tipologia si presentano ridotti e degradati a lembi relitti, a causa dell'intenso sfruttamento per ceduzione e pascolamento. In un limitato settore, corrispondente a un'area di confine con la Basilicata, si sviluppa il Bosco Difesa Grande di Gravina di Puglia, caratterizzato dalla presenza di cerro e farnetto (Biondi *et al.*, 2010). La Cimosà Litoranea rappresenta una stretta fascia costiera pianeggiante dove, l'elevata antropizzazione, ha relegato in aree marginali la naturalità esistente, rappresentata da macchia mediterranea e da aspetti di vegetazione tipici di costa sabbiosa e rocciosa. La Murgia di Sud Est è caratterizzata da formazioni boschive a fragno (*Quercus trojana*), specie trans-adriatica esclusiva in Italia delle Murge pugliesi, dove occupa un limitato settore corrispondente ad una peculiare isola bioclimatica. Attualmente tali nuclei boschivi sono rappresentati in prevalenza da pascoli arborati e da cedui, molto rare sono invece le fustaie (Biondi *et al.*, 2010). Il Salento delle Murge rappresenta un'area di transizione e di raccordo tra il Tavoliere di Lecce e i rilievi collinari dell'Anfiteatro Tarantino e la Murgia dei Trulli. Quest'area è attualmente povera di vegetazione spontanea, ma accoglie vari elementi floristici più mesofili rispetto a quelli del Tavoliere di Lecce. Il Tavoliere Salentino è costituito da un'area pianeggiante corrispondente alla parte centrale della penisola salentina ad elevato sviluppo agricolo nella quale sono presenti solo piccoli e isolati boschi di leccio. La naturalità residua è presente in una fascia strettamente costiera, sia adriatica che ionica. I boschi di leccio sono pochi e degradati, relitti dell'antica copertura forestale che interessava la zona (Biondi *et al.*, 2010). Nella parte settentrionale di questa sub-regione, si rinvencono boschi a quercia da sughero. In Salento, la prevalente presenza di substrato roccioso affiorante ha consentito la sopravvivenza di importanti nuclei di macchia mediterranea e, in particolare, di formazioni a *Quercus calliprinos*, e, sporadicamente, si riscontra la presenza in forma spontanea della quercia vallonea (*Quercus ithaburensis* subsp. *macrolepis*), una specie di dubbio indigenato, a diffusione balcanica. Nelle aree e con substrato profondo si rinvencono leccete (Di Pietro *et al.* 2007) nelle quali compaiono frequentemente *Quercus virgiliana* e *Q. amplifolia*. I boschi a dominanza di specie semi-caducifoglie, presenti nella regione sono stati inquadrati nelle associazioni *Irido collinae-Quercetum virgilianae*, *Cyclamino hederifolii-Quercetum virgilianae* e *Stipo bromoidis-Quercetum*

*dalechampii* (Biondi *et al.*, 2010). I fragneti delle Murge di Sud Est sono stati invece attribuiti all'associazione *Euphorbio apii-Quercetum trojanae*, della classe *Quercetea ilicis*, con due subassociazioni: la tipica, più termofila, e la subassociazione *poetosum sylvicolae*, arricchita di elementi mesofili dei *Quercetalia pubescentis-petraeae* e dei *Querco-Fagetea* (Biondi *et al.*, 2010). All'associazione *Teucrio siculi-Quercetum trojanae* sono state invece riferite analoghe formazioni a *Quercus trojana*, presenti sui settori sommitali delle gravine dell'arco jonico e sui ripiani della Murgia materana e laertina, più mesoxerofile, pure o miste a *Quercus trojana* e *Quercus virgiliana* (Biondi *et al.*, 2010).

## Capitolo 3

### Marcatori molecolari utilizzati per lo studio del genere *Quercus*

#### 3.1 Tecniche per lo studio della variabilità genetica

Il concetto di variabilità genetica è al centro della teoria darwinistica dell'evoluzione, dato che rappresenta la base su cui opera la selezione naturale e, la genetica di popolazione ne studia i cambiamenti nel corso del tempo sotto l'influenza di fattori come la deriva genetica, il flusso genico, le mutazioni, l'accoppiamento non casuale e la selezione naturale (Campbell, 2002). Lo studio ed il confronto a livello di geni, introduce il concetto di diversità genetica che consiste nell'apprezzamento delle variazioni e/o delle somiglianze riscontrabili nella sequenza primaria degli acidi nucleici (DNA e RNA) posseduta da individui della stessa specie. I singoli individui si possono infatti caratterizzare per un diverso assortimento allelico per locus, che, insieme alla distribuzione allelica a livello di gruppo, determinano i gradi di diversità genetica tra ed entro le popolazioni. La diversità genetica non coinvolge, infatti, solo i singoli individui, ma caratterizza gruppi di individui con caratteristiche particolarmente affini all'interno della stessa specie. Le popolazioni appartenenti ad una stessa specie condividono lo stesso pool di geni e si mantengono più o meno isolate le une dalle altre solitamente per mezzo di barriere geografiche.

L'analisi della variabilità genetica di una popolazione può essere effettuata mediante l'uso di tecniche molecolari, capaci di rilevare la diversità in individui diversi appartenenti alla stessa specie. Queste tecniche si basano sullo studio di due principali tipi di molecole: proteine e DNA. I marcatori proteici si basano soprattutto sull'analisi di isoenzimi, proteine enzimatiche legate al metabolismo primario e secondario, che differiscono, da individuo ad individuo, nella struttura primaria (Bruni, 2010) le cui differenze sono identificabili tramite elettroforesi su gel. Questa tecnica presenta alcuni limiti dovuti al fatto che solo la parte codificante del DNA viene esplorata e inoltre le proteine candidate per quest'analisi non sono molto numerose, ragion per cui i soli dati isoenzimatici non risultano sufficienti. I marcatori molecolari del DNA si basano sull'analisi di una o più regioni del DNA attraverso diverse metodologie permettendo la caratterizzazione dell'individuo a cui appartiene. Queste regioni di DNA sono note come marcatori molecolari e possono essere rilevate attraverso sonde (*probe*) o inneschi (*primer*) specifici. Un marcatore genetico può essere definito come una

caratteristica ereditaria che presenta una certa variabilità tra i diversi individui che costituiscono una popolazione e che contraddistingue la regione cromosomica che lo contiene (Pè, 1992). L'analisi della variabilità all'interno e fra popolazioni di specie vegetali con l'utilizzo di marcatori genetici permette così di valutare le diversità reali presenti all'interno del materiale genetico indagato, ovvero analizzandone i polimorfismi. Al fine di stimare la variabilità genetica di una popolazione vegetale, è necessario selezionare i marcatori attraverso precisi criteri sperimentali. La scelta della tecnica da adottare per eseguire misure della variabilità genetica dipende da diversi fattori legati a:

- conoscenza della specie e del suo genoma
- numero di popolazioni da analizzare
- tempi e costi dell'analisi

L'introduzione di marcatori del DNA e delle tecniche di DNA fingerprinting ha fornito un buon sistema di discriminazione in grado di fornire un utile contributo nell'identificazione di specie (Hatzopoulos *et al.*, 2002). Questo tipo di marcatori sono distribuiti infatti in tutto il genoma, trascritto e non, quindi possono contraddistinguere anche regioni introniche e regioni di regolazione, permettendo di rilevare differenze tra individui geneticamente simili e fenotipicamente indistinguibili. Un “marcatore ideale” deve però possedere alcuni requisiti per una sua pratica utilizzazione quali:

- carattere mendeliano;
- stabile nel tempo;
- neutro (senza effetti sul fenotipo);
- altamente polimorfo (presenza di elevata variabilità);
- facilmente individuabile;
- evidenziabile direttamente sul DNA;
- riproducibile;
- analizzabile con tecniche economiche.

Alcuni marcatori, come gli RFLP, sono basati sul procedimento di ibridazione tipo “Southern” (*Southern Blot Ibridation*, SBH), mentre altri, RAPD, SSR (microsatelliti), AFLP (SAMPL, S-SAP), sono basati sulla “Reazione a Catena della Polimerasi” (PCR, *Polimerase Chain Reaction* – fig.3.1). Tra tutte queste tecniche è inoltre possibile fare un'ulteriore distinzione tra: i) marcatori a “multi-locus”, basati sull'analisi simultanea di molti loci genomici, che applicano l'amplificazione di tratti cromosomici casuali con

inneschi oligonucleotidici a sequenza nota (ad esempio, RAPD, AFLP, ecc.); ii) marcatori a “singolo-locus”, che invece prevedono l’amplificazione di tratti cromosomici a sequenza nota mediante l’utilizzo di sonde o inneschi specifici per determinati loci genomici (ad esempio, RFLP e SSR). I primi sono marcatori di tipo dominante (ad ogni locus si può evidenziare la presenza o l’assenza della banda, ma non è possibile distinguere la situazione eterozigote da quella omozigote per lo stesso allele marcatore), mentre i secondi sono marcatori di tipo co-dominante (permettono cioè di distinguere i loci omozigoti da quello eterozigote). Per lo studio della variabilità molecolare del genere *Quercus* sono state utilizzate fin’ora numerose tecniche di analisi molecolare, in particolare, i marcatori molecolari (SSR, RAPD, RFLP, AFLP, ecc..) consentono un’indagine genetica dettagliata, analizzando quei tratti di DNA che in genere non sono espressi col vantaggio di ottenere un elevato grado d’informazioni sulle differenze genetiche degli individui di una popolazione.

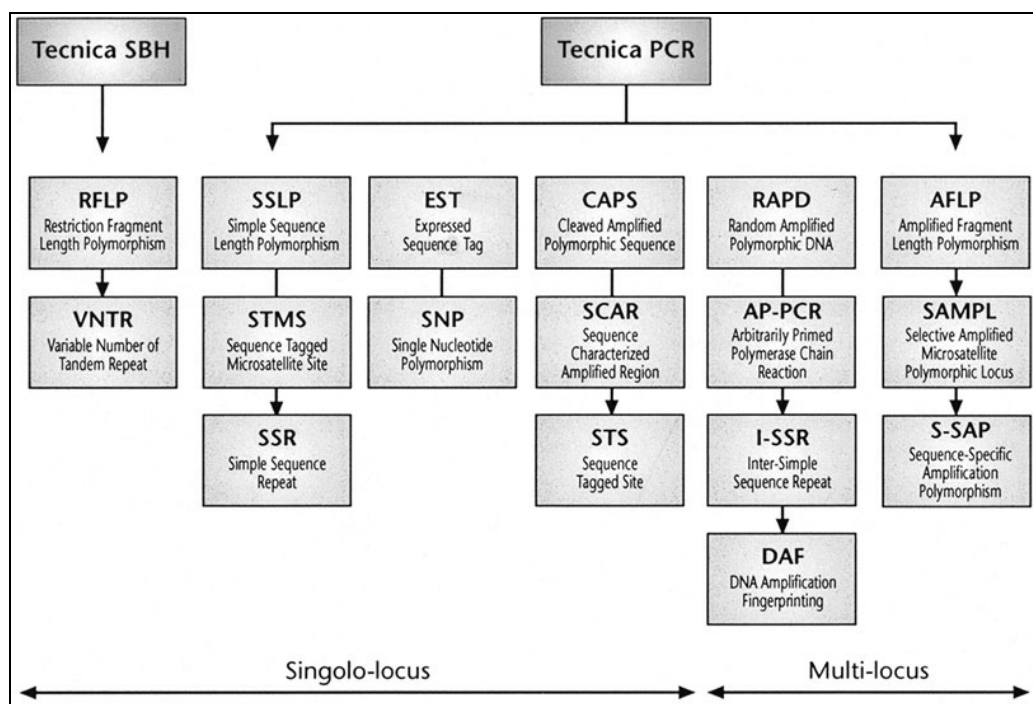


Fig.3.1. Schema delle principali classi di marcatori molecolari utilizzabili per l’analisi del genoma. La classificazione adottata si basa sulla tecnologia utilizzata (SBH-Southern Blot Hybridization o PCR, Polymerase Chain Reaction) e sul numero di loci saggiati (single-locus o multi-locus) (Bruni, 2010).

### 3.2 Marcatori proteici: isoziimi e alloziimi

I primi marcatori molecolari, gli isoenzimi - “varianti di un sistema enzimatico, separabili per elettroforesi” (Bergmann *et al.* 1989) - sono stati gli unici marcatori molecolari disponibili fino alla fine degli anni ‘70. Il termine “isoenzima” (o isozima) è stato proposto da Markert e Moller (1959) per indicare l’insieme delle differenti forme

molecolari multiple di un enzima, dette isoforme, che catalizzano la stessa reazione biochimica. Gli isoenzimi (isozimi) sono codificati dai geni di uno o più loci e l'elettroforesi isoenzimatica permette di rilevare la variabilità che ricorre in molte proteine enzimatiche: differenze varietali sono evidenziate attraverso il polimorfismo isoenzimatico. Poiché le sequenze di amminoacidi delle proteine sono determinate dalle sequenze del nucleotide del gene, "l'analisi di una struttura proteica, usando l'elettroforesi, è in prima approssimazione, un'analisi del gene" (Gottlieb, 1977). Il polimorfismo isoenzimatico è un semplice marcatore per analizzare le relazioni genetiche nella popolazione (Gottlieb, 1981). Di recente si è cominciato ad usare in maniera sempre maggiore le analisi multilocus degli isoenzimi, per la genetica di popolazione. Le analisi multilocus considerano i risultati per vari loci e le varianti che sono codificate dagli alleli di uno o spesso più loci, sono chiamate allozimi. Nel genere *Quercus* sono stati effettuati alcuni studi sui polimorfismi degli allozimi, ma attualmente, questa non è una tecnica molto utilizzata per lo studio della variabilità genetica di questo genere (Viscosi, 2007). Attraverso questi marcatori è stato però possibile realizzare numerosi studi volti all'analisi della diversità e differenziazione genetica, del mating system, del flusso genico e della caratterizzazione varietale (Fineschi *et al.*, 1999). Uno studio effettuato su querce mediterranee e sempreverdi (Toumi L. *et al.* 2001), ha messo in evidenza la potenzialità di queste tecniche nel valutare la distribuzione degli allozimi nelle specie, il polimorfismo e la ricchezza allelica, la diversità genetica intra- ed inter-specifica ed infine analisi filogenetiche (Viscosi, 2007). Al tempo stesso anche gli isozimi sono stati utilizzati nelle analisi di diversità genetica delle querce (Buck G.W. *et al.* 1998; Streiff R. *et al.* 1998), entrambe le tipologie di analisi sono solitamente accostate ad altri dati, sia molecolari sia morfologici (Barreneche T. *et al.* 1998). Oggi i marcatori isoenzimatici sono poco utilizzati e i genetisti che si occupano di analisi di popolazione o di miglioramento genetico preferiscono utilizzare tecniche più precise e di più certa interpretazione.

### **3.3 Tecniche basate sulla reazione PCR**

I marcatori molecolari oggi maggiormente utilizzati sfruttano, per l'analisi dei polimorfismi, la reazione della PCR (*Polymerase Chain Reaction*), metodologia messa a punto nel 1984 da Kary Mullis che permette una rapida ed elevata amplificazione in vitro di specifiche sequenze di DNA. Questa reazione riesce ad attivare in provetta lo stesso processo di duplicazione del DNA che si verifica nelle cellule vive. Partendo

infatti da una sequenza di DNA conosciuta, vengono sintetizzati chimicamente due frammenti di DNA lunghi una ventina di nucleotidi che funzionano da innesco, o *attivatori*, complementari ai due filamenti del DNA da amplificare. Gli oligonucleotidi che fungono da *primers* sono necessari in quanto l'enzima di sintesi impiegato nella PCR è in grado di lavorare su uno stampo solamente se ha già a disposizione i due estremi del tratto da neo-sintetizzare. Tale processo viene indotto da un enzima, la DNA-polimerasi, che assolve diverse funzioni fra cui la riparazione e la duplicazione del DNA (Arnheim *et al.*, 1990).

Il metodo di amplificazione prevede tre fasi fondamentali:

- *Denaturazione*: separazione delle doppie eliche che costituiscono le molecole di DNA. Il DNA a doppio filamento viene denaturato ad una temperatura che è determinata in parte dal contenuto in G+C. Nelle PCR catalizzate dalla Taq DNA polymerase, la denaturazione è effettuata a 94-95°C, che è la più alta temperatura che l'enzima può tollerare per 30 o più cicli senza essere danneggiato.
- *Annealing*: appaiamento dei primer al DNA. L'abbassamento della temperatura permette ai primer oligonucleotidici di appaiarsi alla sequenze complementari presenti nelle molecole di DNA, definendo i punti d'inizio della sintesi. La temperatura di annealing è di solito scelta 3-5°C più bassa della temperatura di melting alla quale i primer si dissociano dal loro template.
- *Allungamento*: l'estensione dei primer oligonucleotidici è condotta alla temperatura ottimale per la sintesi di DNA catalizzata dalla Taq che è 72° C. Quest'ultima è una polimerasi termoresistente proveniente da *Thermus aquaticus*, un batterio termofilo che riesce a vivere in acqua a 75°C producendo un enzima in grado di rimanere attivo per una serie completa di cicli di amplificazione (Watson *et al.*, 1998).

Mediante una serie di cicli termici, caratterizzati dal ripetersi di queste tre fasi, si ottiene un'amplificazione esponenziale della sequenza di "DNA target" in soluzione. I nuovi filamenti di DNA che vengono sintetizzati a partire da ciascun primer si estendono sino alla posizione del primer del filamento opposto generando, in ciascun filamento di DNA di nuova sintesi, nuovi siti a cui si appaierà il primer nel ciclo successivo.

### **3.3.1 PCR multiplex**

La PCR multiplex permette di amplificare simultaneamente più di una regione di DNA, aggiungendo più set di primers specifici per le sequenze target. Affinché una reazione

multipla di PCR multiplex fornisca risultati corretti, è necessario che le coppie di primers utilizzate siano compatibili, cioè le temperature di annealing degli oligonucleotidi devono essere molto vicine tra di loro. E' inoltre necessario evitare un'eccessiva complementarietà tra primers per non permettere la formazione di dimeri tra i primers: in questa situazione il primer si unisce ad un altro primer invece di legarsi al DNA target. Negli ultimi anni la tecnica della PCR multiplex è sempre più utilizzata (Hayden *et al* 2008; Kawalko *et al* 2009.), tuttavia, sono ancora poco comuni i protocolli che prevedono l'utilizzo simultaneo con otto o più marcatori (Hill *et al.* 2009), a causa delle laboriose procedure per lo sviluppo dei protocolli stessi. L'avvento, però, di nuovi software per la progettazione di primer che limitano l'interazione in fase di PCR e selezionano le migliori combinazioni di loci (Holleley & Geerts, 2009) permette oggi una identificazione veloce e conveniente degli SSR (Abdelkrim *et al.*, 2009; Santana *et al.*, 2009). Per quanto riguarda lo studio del genere *Quercus*, l'analisi dei polimorfismi viene effettuata da diversi anni con marcatori molecolari (Dow *et al* 1995; Steinkellner *et al.*, 1997; Kampfer *et al.*, 1998), ma solo nell'ultimo decennio sono effettuati i primi studi che hanno previsto l'utilizzo di PCR multiplex con più di cinque loci micro satellite (Dzialuk *et al.*, 2005; Lepais *et al.*, 2006). In particolare, lo sviluppo di due kit (Guichoux *et al.*, 2011b) per la PCR multiplex (12-plex expressed sequence tag - eSSRs e 8-plex genomic-SSR gSSRs) ha reso possibile ottimizzare costi ed efficacia rivelandosi particolarmente utili nell'identificazione degli ibridi nel genere *Quercus* (Durand *et al.*, 2010, Viscosi *et al.*, 2011, Neophytou *et al.*, 2013).

### **3.4 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)**

Questa tecnica si basa sull'amplificazione in PCR di regioni casuali del DNA con l'ausilio di un unico primer di sole 10-20 paia di basi. La ridotta dimensione dei primers consente un facile appaiamento dei medesimi alle zone complementari del DNA genomico. Il numero di frammenti prodotti dipende da due fattori: la sequenza del primer e la dimensione del DNA genomico della specie in studio. I frammenti, separati su gel di agarosio ad elevato potere risolutivo ed evidenziati con etidio bromuro, vengono osservati su trasluminatore a luce ultravioletta. La tecnica presenta alcuni limiti, quali: ripetibilità dell'amplificazione, possibilità di influenzare la reazione attraverso l'estrazione di DNA, determinazione della concentrazione dei reagenti, qualità del materiale utilizzato, ecc (Barret *et. al.*, 1997). Altro svantaggio è dovuto al fatto che i RAPD sono marcatori dominanti, e quindi in grado di fornire un basso livello



di informazione. Questa tecnica è stata applicata con successo in molti studi sul genere *Quercus*: per la valutazione della diversità genetica totale intraspecifica e comparazioni tra popolazioni di una stessa specie (Barret l.c.; Song J. *et al.* 2002; Yakovlev I.A. *et al.* 2002. Schiller G. *et al.* 2004); analisi della diversità intraspecifica e intraindividuale con riferimento alla diversità clonale (Alfonso-Corrado C. *et al.* 2005 ), associata alla diversità genetica nelle e tra le popolazioni (Barret *et al.*, l.c.), per indagini sul grado di polimorfismo nelle sequenze di DNA (Sánchez M.C. *et al.*, 2003); per la valutazione del grado d'ibridazione tra specie simpatriche in determinate aree geografiche (Williams *et al.* 2001; Gonzàles-Rodriguez *et al.* 2004). Recentemente (<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/>), sono state calcolate nuovamente le frequenze RAPD per 2800 frammenti, tra i quali 36 hanno mostrato differenze significative tra *Q. petraea* e *Q. robur*. Ciò evidenzia che in specie del genere *Quercus* (gr. *Robur*) caratterizzate da evidenti differenze fenotipiche, il grado di differenziazione genetica è estremamente basso probabilmente perché le regioni genomiche con differenze interspecifiche significative sono particolarmente rare.

### **3.5 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)**

La tecnica AFLP è molto sensibile nel trovare polimorfismi in tutto il genoma. La procedura è stata pubblicata per la prima volta nel 1995 e successivamente modificata, in campo vegetale, nel 2000 (Ranamukhaarachchi *et al.*, 2000). Questa tecnica prevede alcuni passaggi chiave quali:

- Estrazione del DNA e digestione con enzimi di restrizione.
- Ligazione di adattatori ai frammenti prodotti (questi adattatori terminano con una sequenza complementare al sito di restrizione e si attaccano ai frammenti di DNA).
- Amplificazione (PCR) con primers identici agli adattatori ma con 2-3 basi azotate in più: in questo modo non si amplificano tutti i frammenti ma solo una parte degli stessi.
- Separazione dei frammenti amplificati su gel di poliacrilamide.

Gli AFLP: sono molto informativi e polimorfici, possono essere universalmente applicabili a tutti gli organismi viventi e permettono l'analisi contemporanea di un grosso numero di loci genetici consentendo di studiare la diversità genetica delle specie sotto il profilo dell'evoluzione del genoma, della filogenesi e della distribuzione geografica della variabilità. La tecnica permette inoltre di produrre sia marcatori dominanti (85% dei casi circa), sia codominanti. Dunque sono da considerarsi un ottimo strumento per scopi di fingerprinting mappaggio e analisi di linkage. La tecnica

richiede però di disporre di DNA in grande quantità e di elevata qualità rivelandosi inoltre molto costosa. Pochi studi sulle specie del genere *Quercus* sono stati effettuati con questa tecnica: De Greff *et al.* (1998) proposero una speciale tecnica AFLP chemio-luminescente applicandola a *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. Ziegenhagen *et al.* (1999) effettuarono uno studio pilota per verificare la validità degli AFLPs come marcatori molecolari utili allo studio delle relazioni familiari intra e tra popolazioni, su alcune specie di querce (*Quercus spp.*).

### **3.6 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Gli RFLP sono marcatori che permettono di analizzare il polimorfismo generato nel DNA dopo digestione con enzimi di restrizione. L'uso degli enzimi permette di individuare sequenze nucleotidiche specifiche e tagliare in corrispondenza o nelle vicinanze di queste sequenze; i frammenti così ottenuti sono chiamati "Restriction Fragment Length Polymorphisms" (RFLPs) (Beckmann e Soller, 1986). I grossi vantaggi di questi marcatori risiedono nella loro codominanza, nella distribuzione uniforme sul genoma, nella mancanza di effetti pleiotropici, nell'eredità mendeliana (RFLP genomici) e nell'eredità materna (RFLP degli organelli) e infine nella possibilità di generare un numero pressoché illimitato di polimorfismi semplicemente variando le combinazioni sonda-enzima. Questa tecnica è però molto complessa e laboriosa e presenta elevati costi. Questa tecnica è stata applicata per lo studio del DNA plastidiale nel genere *Quercus*, per l'identificazione degli aplotipi e per valutare la diversità intraspecifica ed inter-popolazionale a livello organellare. Questa tecnica ha trovato largo impiego per l'analisi del DNA plastidiale nel genere *Quercus*, grazie a una procedura PCR-RFLP, definita da un protocollo di lavoro (Doumoulin Lapegue *et al.* 1997) seguito da numerosi laboratori europei. Alcuni studi sono stati effettuati in ambiti geografici minori (Csaikl U.M *et al.* 2002a, 2002b; Fineschi S. *et al.* 2002; Petit R. J. *et al.* 2002b; Bordacs S. *et al.* 2002; Jensen J.S. *et al.* 2002; Lopez de Heredia U. *et al.* 2005) al fine di valutare la ricchezza ed il pattern di diversità genetica nelle popolazioni e tra le popolazioni. I risultati sono stati spesso confrontati con altre tipologie d'indagine molecolare (Kremer A. *et al.* 2002; Petit R.J. *et al.* 2005a, 2005b), relazionati ad aspetti di ibridazione ed introgressione (Belahabib N. *et al.* 2001; Petit R.J. *et al.* 2003a; Morales R. *et al.* 2005), di impatto antropico (Cottrell J.E. *et al.* 2002; König A.O. *et al.* 2002), biogeografici (Fineschi S. *et al.* 2004; Deguilloux M.F. *et al.* 2003) e palinologici (Petit R.J *et al.* 2003b). Lavori riassuntivi dei contributi a scala

locale, hanno portato alla valutazione del pattern di diversità e degli aspetti filogeografici sulla base della variabilità cloroplastica di 2600 popolazioni europee di querce del sottogenere *Quercus* (Petit R.J. *et al.* 2002a), e in associazione a dati pollinici e paleogeografici hanno permesso di identificare i rifugi ed i processi di colonizzazione post-glaciali (Petit R.J. *et al.* 2002c). Questi metodi sono stati applicati anche ad altri gruppi del genere *Quercus* (Magni C.R. *et al.* 2005; Lumaret R. *et al.* 2002; Gonzalez-Rodriguez A. *et al.* 2004) e mediante analisi filogenetica e di diversità genetica, hanno portato a valutare a livello europeo, il grado di polimorfismo del DNA plastidiale e a definire i rapporti filogenetici tra gli aplotipi.

### **3.7 ITS (Internal Transcribed Spacer)**

Il DNA ribosomale (rDNA) codifica per la componente di RNA del ribosoma, ed è una famiglia multigene con copie nucleari allineate insieme, negli eucarioti. Queste sono organizzate in NOR (Nucleolus Organiser Regions), potenzialmente a più di una locazione cromosomica. Ogni unità in una singola copia consiste nel gene codificante per le subunità dell'rRNA, piccola e grande (18S and 28S). Il gene 5.8S è posizionato a incastro tra questi due geni ma è separato da due zone di trascrizione interna: ITS1 and ITS2. La zona di trascrizione esterna (ETS) e la zona intergenica (IGS) separano le subunità grande e piccola di rDNA. Le sequenze ITS non codificano per un prodotto genico, sono soggette ad una elevata variabilità di sequenza che genera polimorfismo. Questa variabilità è spesso associata alla presenza o assenza di siti di restrizione e può essere sfruttata per il riconoscimento di specie tramite PCR-RFLP. Inoltre, la loro localizzazione tra geni altamente conservati (18S e 28S) permette l'utilizzo di primers uguali tra specie diverse o organismi diversi (primers universali). Differenti forze selettive agiscono sulla regione di rDNA con la conseguenza di modificare i livelli di sequenze conservate tra le singole unità ripetute. Perciò, ogni parte può essere utilizzata per le analisi filogenetiche specifiche in ampi spettri tassonomici (Hills & Dixon, 1991). La subunità piccola è altamente conservata ed è stata usata per fare luce su degli antichi rami evoluzionistici, come ad esempio per le relazioni tra *Archaeobacteria* and *Eubacteria*. Le regioni ITS sono state utilizzate per filogenesi di popolazioni congeneriche (Bayer *et al.* 1996) o associate a marcatori molecolari e a morfologia fogliare per lo studio di specie simpatriche (Duminil *et al.*, 2012). Le analisi ITS sono state applicate diverse volte alle specie del genere *Quercus*. Si è osservato che in *Quercus cerris*, *Q. ilex*, *Q. petraea*, *Q. pubescens* e *Q. robur* il numero copie di geni

18S-5.8S-28S dell'rRNA in genomi diploidi sono in un range di 1300-1400 (Zoldos *et al.* 1999). Queste tecniche di analisi sono state utilizzate per le analisi filogenetiche a diversi livelli tassonomici, infatti sono stati effettuati studi sull'intera famiglia delle *Fagaceae* (Manos *et al.*, 2001), oltre che a livello di genere e sottogene. Gli studi filogenetici più importanti a livello di genere, effettuati mediante il sequenziamento delle regioni ITS, sono stati proposti da Manos *et al.* (1999) e Samuel *et al.* (1998). Bellarosa *et al.* (2005) hanno applicato queste tecniche per ricostruire un modello filogenetico per le querce italiane, in comparazione con i risultati ottenuti dagli altri autori sopra citati.

### **3.8 Microsatelliti nucleari (SSR, Simple Sequence Repeat)**

I microsatelliti nucleari (SSR, Simple Sequence Repeat) sono sequenze ripetute di DNA non codificante caratterizzate da una ripetizione in tandem di una stessa sequenza - tipo (CA)<sub>n</sub>, (GCC)<sub>n</sub>, (GATA)<sub>n</sub>, ecc. - di 2- 6 basi azotate. I microsatelliti cloroplastici (cpSSRs), sono simili ai microsatelliti nucleari, ma ogni ripetizione è solitamente di solo 1 bp (Proven *et al.*, 1999). È stato stimato che esiste, in media, una regione SSR ogni 50-750 Kb, in funzione del tipo di motivo ripetuto; la ripetizione AT è la più frequente nelle piante mentre nei mammiferi è più frequente la ripetizione AC/TG. I microsatelliti sono diffusissimi e dispersi in tutti i genomi, negli animali come nelle piante, nei lieviti, nei batteri e nei cloroplasti; presentano inoltre un livello elevato di iper-variabilità all'interno di ciascuna specie; questa caratteristica li rende un ottimo strumento sia per la mappatura sia per il fingerprinting. È stato infatti stimato che la frequenza nel genoma delle piante sia di una SSR ogni 50 kb, valore alquanto variabile da specie a specie. Inizialmente le analisi dei microsatelliti erano basate sulla tecnica RFLP, si è poi dimostrato più conveniente l'uso della tecnica PCR grazie a coppie di primer in grado di riconoscere e quindi amplificare la regione. Attraverso l'utilizzo di primer specifici, complementari alle regioni che fiancheggiano le sequenze ripetute, è possibile amplificare queste zone e le regioni amplificate sono poi separate mediante elettroforesi su matrici ad alta risoluzione. Negli ultimi anni gli amplificati vengono separati su gel di acrilamide mediante l'uso di sequenziatori automatizzati. I primer consentono di amplificare singoli microsatelliti che possono differire tra individui non per il motivo di base, ma per il numero di volte che questo motivo è ripetuto. Gli SSR sono una classe di marcatori molecolari capaci di mettere in evidenza all'interno delle popolazioni analizzate una diversità genetica difficilmente rilevabile con altri tipi di marcatori, poiché i polimorfismi sono localizzati in regioni iper-variabili e non espresse

del genoma. I vantaggi dei microsatelliti risiedono nella loro elevata riproducibilità e nel loro elevato grado di polimorfismo dovuto all'alto tasso di mutazione delle sequenze. Una delle cause della mutazione è lo scivolamento (*slippage*) della polimerasi durante la duplicazione della sequenza: un fenomeno che crea l'allungamento del microsatellite stesso in una delle due catene. Il microsatellite, nonostante lo scarso significato biologico della sua sequenza, può essere considerato un *locus* genetico a tutti gli effetti. E' provato che la tecnica permette di mettere in evidenza una elevatissima diversità genetica poiché i polimorfismi sono dovuti a varianti alleliche, nello stesso locus: il numero di alleli riportato per singolo locus SSR può variare fino a 20 nel genere *Quercus*.

L'uso dei microsatelliti presenta grandi vantaggi rispetto ad altri sistemi: la grandezza dei prodotti amplificati è piccola ed è perciò possibile ottenere risultati a partire da DNA degradato in frammenti anche minori di 1.000 kb. Tasso di mutazione elevato (Goldstein e Schlötterer, 1998), alto numero di alleli (fino a 50) ed elevati livelli di eterozigotità (compresa fra 50 e 100%) costituiscono altre caratteristiche peculiari dei microsatelliti, grazie alle quali essi vengono attualmente considerati come strumenti ideali negli studi di genetica di popolazione (Dayanandan *et al.*, 1998), per l'identificazione di popolazioni differenziate (Schlötterer, 2004) e per la caratterizzazione di cultivar nelle specie agronomiche (Scippa *et al.*, 2008, D'Imperio *et al.*, 2011). Inoltre, la piccola grandezza delle unità amplificate permette lo studio simultaneo di vari loci mediante amplificazione con PCR-multiplex. Tutte queste caratteristiche fanno sì che siano un buono strumento per lo studio di struttura di popolazione, diversità, ibridazione, differenziazione e analisi di paternità nello studio delle *Fagaceae* (Bruschi *et al.* 1998). Di contro questa tecnica ha un'interpretazione delle bande non sempre semplice, alti costi iniziali e una messa a punto lunga e difficile per identificare e sequenziare i microsatelliti al fine di disegnare i primer da unire per la loro amplificazione. Alcuni aspetti costituiscono infatti una limitazione, conducendo a errori nella genotipizzazione (o *scoring*). Lo *scoring* rappresenta il primo passo di analisi di dati grezzi di lunghezza dei frammenti e consiste nell'individuare tutti gli alleli presenti ad un dato *locus* (Dewoody *et al.*, 2006). Esistono numerose fonti d'errore legate allo *scoring* dei genotipi microsatellite, tra cui *stuttering*, *large allele drop-out* e presenza di alleli nulli, che sono di particolare importanza in quanto contribuiscono ad una errata valutazione delle frequenze alleliche e genotipiche che può, in linea definitiva, causare l'errore nell'interpretazione dei dati. In particolare, nella

maggior parte dei casi, questi errori portano ad una sottostima degli eterozigoti che genera una deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) non dovuta a fenomeni evolutivi, ma ad artefatti della fase sperimentale (Dewoody *et al.*, 2006). Il termine *stuttering* si riferisce alla produzione di picchi in una posizione diversa da quella dell'allele parentale, causata dallo slittamento lungo un intero *repeat* della polimerasi durante la PCR, che provoca la perdita di quest'unità. L'allele genotipizzato risulta essere quindi più piccolo rispetto all'allele parentale. L'errore di *stuttering* è tipico dei *loci* dinucleotidici. L'interpretazione di questi *loci* può risultare difficoltosa, quando si è in presenza di un genotipo eterozigote per alleli adiacenti. In questo caso, infatti, lo *stuttering* può portare a considerare questo genotipo eterozigote come un omozigote per l'allele più grande. Una serie di errori commessi in questa maniera potrà di conseguenza portare a sovrastimare le frequenze degli alleli più grandi, diminuendo l'eterozigosità osservata e aumentando apparentemente il livello di *inbreeding* nei loci affetti (Dewoody *et al.*, 2006). Il *Large allele drop-out* (o perdita di alleli grandi in bp), costituisce un altro potenziale errore di scoring ed è osservato principalmente nei *loci* che presentano grandi differenze nelle dimensioni alleliche (Björklund, 2005 causando sovrastime delle frequenze di alleli più corti (Dewoody *et al.*, 2006). Infine, gli alleli nulli sono i più difficili da individuare in quanto sono alleli presenti nella popolazione che però non vengono amplificati. Ciò avviene a causa di una mutazione nel sito di *annealing* del primer che non permette il suo aggancio, impedendo l'amplificazione del frammento. La presenza di alleli nulli in un data set fa sì che gli eterozigoti per l'allele nullo possano essere classificati come omozigoti, mentre individui la cui amplificazione fallisce completamente potrebbero essere omozigoti per tale allele (Dewoody *et al.*, 2006). A questi errori, si affianca la soggettività dell'interpretazione dell'operatore per cui la strategia ideale per minimizzare gli errori di scoring prevede un'accurata serie di controlli manuali.

Allo stato attuale la tecnica SSR si è dimostrata in grado di fornire marcatori molto affidabili e utili per la risoluzione del problema dell'identificazione varietale e della tipizzazione genetica del genere *Quercus* in quanto caratterizzati dall'alta trasferibilità, dall'elevato polimorfismo e, aspetto particolarmente interessante per le querce, dalla co-dominanza che li distingue dai marcatori RAPD e AFLP. Per l'analisi della variabilità nel genere *Quercus*, sono stati sviluppati una cinquantina di microsatelliti, sia per le querce pedunculato che sessili (Lepais, 2010). Questi marcatori sono stati utilizzati sia

per studiare la struttura genetica delle popolazioni (Degen *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 2003; Mariette *et al.*, 2002; Muir *et al.*, 2004; Streiff *et al.*, 1999; Streiff *et al.*, 1998) che per la costruzione di mappe genetiche (Barreneche *et al.*, 1998). Alcuni di questi marcatori sono stati amplificati con successo anche nel castagno (Barreneche *et al.*, 2004; Boccacci *et al.*, 2004), rivelando che, sebbene il numero di ripetizioni del motivo di base è variabile tra individui e tra specie, le sequenze fiancheggianti i microsatelliti rimangono relativamente costanti permettendo così l'amplificazione degli stessi marcatori anche in specie diverse (Barreneche *et al.*, 2004; Casasoli *et al.*, 2006). Ad oggi, numerosi sono i lavori in cui sono state analizzate, mediante SSR, anche con PCR multiplex, popolazioni simpatriche di querce costituite da più specie e dai loro ibridi, sia per l'analisi della variabilità genetica inter- ed intra-specifica delle popolazioni (Bruschi *et al.* 1998, 2000; Muir & Schlotterer, 2005; Curtu, Gailin & Finkeldey, 2007a, Curtu *et al.*, 2007b; Gugerli *et al.*, 2007; Lepais *et al.*, 2009; Lopez de Heredia *et al.*, 2009; Salvini *et al.*, 2009, Viscosi *et al.* 2009, 2012) che per lo studio della struttura delle popolazioni (Neophytou *et al.* 2010). Spesso a queste ricerche si sono affiancate ad analisi di tipo morfologico e micro-morfologico (Bruschi *et al.* 2000; Fortini *et al.*, 2009-2013, Viscosi *et al.*, 2009-2011-2012), oppure a studi sui valori di concentrazione di composti organici nelle foglie (Klaper *et al.* 2001) o con isozimi (Streiff *et al.* 1998). Studi effettuati con micro satelliti nucleari a scala geografica europea (Muir *et al.* 2000; Muir & Schlotterer, 2005), su *Q. petraea* e *Q. robur* hanno rilevato che la bassa differenziazione genetica tra le due specie considerate, è dovuta all'ancestralità comune e all'alto grado di flusso genico. Muir & Schlotterer (2005) identificano tre ipotesi per spiegare la conservazione della divergenza nucleare e fenotipica, nonostante vi siano alleli in comune:

- (1) bassi livelli di flusso genico interspecifico;
- (2) selezione operante su un subset di loci e in grado di mantenere l'integrità specifica, nonostante l'importante flusso genico;
- (3) polimorfismo ancestrale comune.

Lexer *et al.* (2006) affermano che mentre la selezione è relativa ad un limitato numero di loci, la maggior parte del genoma nucleare è permeabile al flusso genico interspecifico (Viscosi, 2007). Negli ultimi anni, l'applicazione dei microsatelliti nucleari ha permesso di verificare i rapporti di flusso genico interspecifico ed il grado di ibridazione tra specie del genere *Quercus*, in Europa; spesso, dove gli areali delle specie

quercine coincidono, è stato evidenziato un notevole flusso genico inter-specifico e la relativa esistenza di un vasto numero di ibridi (Grandjean & Sigaud, 1987). Incroci controllati tra farnia e rovere hanno mostrato che la farnia ha delle frequenze d'incrocio maggiori quando impollinata con polline proveniente dalla rovere piuttosto che il contrario (Muir *et al.*, 2000). Sebbene quindi l'incrocio avvenga di norma nella direzione da rovere (impollinante) a farnia (porta seme) (Bacilieri *et al.*, 1993; Bacilieri *et al.*, 1994), studi su boschi misti della pianura piemontese non escludono la possibilità anche dell'incrocio reciproco (Belletti & Leonardi, 1997). In Francia, una ricerca condotta sui boschi misti di *Q. petraea*, *Q. pubescens*, *Q. pyrenaica* e *Q. robur* (Lepais *et al.*, 2009; Viscosi *et al.*, 2009) mediante SSR ha rivelato un tasso di ibridazione tra le specie estremamente variabile nei diversi siti di campionamento evidenziando che specie relativamente abbondanti possono avere conseguenze sulle dinamiche di ibridazione, influenzando sia il tasso di ibridazione che la direzione dell'ibridazione stessa. Altre recenti ricerche effettuate con l'utilizzo di SSR, hanno permesso di evidenziare che, in un popolamento misto di *Q. petraea*, *Q. robur*, *Q. pubescens* e *Q. frainetto* il basso tasso di ibridazione naturale è caratterizzato da diversi livelli di flusso genico fra le specie parentali, principalmente legato a differenze di natura fisiologica e di struttura spaziale fra gli stand di campionamento (Curtu *et al.* 2007a; 2007b). Da uno studio sul flusso genico in un bosco simpatrico di *Q. petraea* e *Q. pyrenaica* in Spagna, risulta invece che le differenze nella struttura genetica intra-specifiche sono maggiori che quelle inter-specifiche (Valbuena-Carabana *et al.*, 2007).

In Italia, è stato effettuato uno studio su un popolamento misto di *Q. pubescens* e *Q. petraea* che ha rivelato la presenza di flusso genico inter-specifico tra le due specie e la presenza di una introgressione asimmetrica probabilmente legata all'abbondanza relativa del numero di alberi di ciascuna specie (Salvini *et al.*, 2009). Sempre in Italia, per le querce bianche sono presenti alcuni studi genetici effettuati a scala sia nazionale (Fineschi *et al.* 2002, 2004; Bellarosa *et al.*, 2005; Fortini *et al.*, 2009) che regionale, come per la Toscana (Bruschi *et al.*, 2000; Salvini *et al.*, 2009), su popolazioni miste di *Q. petraea* e *Q. pubescens* e per il Molise (Viscosi *et al.*, 2012), su un popolamento misto di *Q. frainetto*, *Q. petraea* e *Q. pubescens*.



## Capitolo 4

### Materiali e metodi

#### 4.1 Provenienza dei campioni

In questo studio sono stati analizzati 905 campioni raccolti da alberi provenienti da 33 aree di campionamento in 41 plot localizzati in popolazioni pure e miste di querce bianche in Italia centro-meridionale (fig. 4.1 – tab. 4.1). Sono inoltre stati inclusi 13 campioni provenienti dalla Slovenia. Gli individui analizzati sono stati raccolti durante il periodo marzo-novembre 2009/2011.



Fig.4.1: Localizzazione delle aree di campionamento.

Le aree di campionamento sono state scelte in base alla copertura vegetale e alle caratteristiche litologiche e morfologiche, per coprire il maggior numero di ambienti differenti. Il protocollo di campionamento ha previsto una prima fase di rilevamento dei dati stazionali (località, quota, esposizione, pendenza, substrato e morfologia. Infine è stato raccolto il materiale vegetale (foglie). Per ogni stand sono stati campionati da 16 a 30 individui per plot (quadrati di 50 m di lato) e per ogni individuo sono state raccolte, in diverse zone della chioma, e a varie altezze, da 3 a 5 foglie. Una parte dei campioni è stata essiccata, opportunamente catalogata e conservata presso il Museo Erbario dell'Università degli Studi del Molise.

n. stand	Id stand	Regione	Nome sito	Località	Toponimo	Comune	Alt.	Esp.	Pendenza	Substrato	Coord. E	Coord. N
1	Stand_1	Puglia	Acquaviva	Collone	Bosco Mesole	Acquaviva delle Fonti	200	-	-	Calcare clayey	650840	4524805
2	Stand_2	Puglia	Accadia	no dauno	Accadia	Deliceto	640	-	-	marlstone	526723	4557220
3	Stand_3	Puglia	Bosco del compare	Costa di Brindisi	Bosco del Compare	Brindisi	40	-	-	Calcare	744270	4504890
4	Stand_4	Puglia	Bosco di acquatetta	Spinazzola	Acquatetta	Spinazzola	600	-	-	Conglomerati	597285	4540867
5	Stand_5	Puglia	Cagnano	L'Agrifoglio	Cagnano Varano	Cagnano Varano	520	-SE	-10	Calcare	567854	4624669
6	Stand_6	Puglia	Chiancate	Gargano	Le Chiancate	Lamis	880	-	-	Calcare	561581	4624043
7	Stand_7	Puglia	Consolazione	Consolazione	Santuario della Consolazione	Deliceto	550	-	-	Argille marnose	534533	4562416
8	Stand_8	Puglia	Deliceto	no Dauno	Dauno	Deliceto	560	-	-	Argille marnose	529921	4564231
9	Stand_9	Puglia	Difesa	no Dauno	Difesa	Accadia	670	-	-	Calcare	530175	4558496
10	Stand_10	Puglia	Difesa	Gravina in	Bosco Difesa	Gravina in Puglia	380	-	-	Conglomerati	618357	4512469
11	Stand_11	Puglia	grande	Puglia	Grande	Gravina in Puglia	380	-	-	Conglomerati	618357	4512469
12	Stand_12	Puglia	Farnetto	Laterza	Grottaturge	Laterza	420	-	-	Calcare	647716	4497035
13	Stand_13	Puglia	Incoronata	Tavoliere	dell'Incoronata	Foggia	75	-	-	Depositi fluviali	553553	4582747
14	Stand_14	Puglia	a	Ruvo di								
15	Stand_15	Puglia	Jazzo	Puglia,								
16	Stand_16	Puglia	pagliara	Lama	Pagliara	Ruvo di Puglia	320	-	-	Calcare	622237	4551101
17	Stand_17	Puglia	Lago									
18	Stand_18	Puglia	laterza	Tafuri	Masseria Tafuri	Laterza	305	-	-	Calcare	656599	4504016
19	Stand_19	Puglia	Lama del	Castellaneta		Castellaneta						
20	Stand_20	Puglia	Lato	Marina	Lama del Lato	Marina	40	-	-	Calcare	658881	4491270
21	Stand_21	Puglia	Santuario di									
22	Stand_22	Puglia	Palmariggi	Montevergine	Montevergine	PalmariggiLE	40	-	-	Calcare	278106	4446957
23	Stand_23	Puglia	i	Murge della	Bosco della							
24	Stand_24	Puglia	Parata	Morsara	Parata	Santeramo	500	-	-	Calcare	647317	4514201
25	Stand_25	Puglia	Pianelle	La Pianella	Bosco della	Martina Franca	460	-	-	Calcare	686693	4502657

19	Stand_19	Puglia	Quasano	Torrito	Pianella Quasani	Torrito	420	-	-	Calcare	632507	4534971
20	Stand_20	Puglia	Santeramo o con R.	Santeramo	Santeramo	Santeramo	490	-	-	Calcare	649110	4523011
21	Stand_21	Puglia	Santeramo o con S.	Santeramo	Stada 271 a Cassano	Santeramo	470	-	-	Calcare	650238	4518821
22	Stand_22	Puglia	Selva San vito	La Terza	Selva San Vito	Laterza	340	-	-	Calcare	654902	4499728
23	Stand_23	Puglia	Umbra	Gargano	Caritate Vico del	Vico del Gargano Vico del	240	SE	5	Calcare selcifera	587298	4635677
24	Stand_24	Puglia	Vico Coreno	Gargano Monti	Gargano	Gargano	240	-	-	Calcare selcifera	587298	4635677
25	Cor	Lazio	Ausonio	Aurunci Monti	Monte Feuci	Coreno Ausonio	470	WNW	5	Calcare	399113	4576941
26	Pda	Lazio	Pozzo d'antullo	Simbruini- Ernici Monti	Pozzo d'antullo	Colleparado	735	SSW	5	Calcare	364046	4626293
27	Acu	Lazio	Acuto	Simbruini- Ernici Monti	Lestra delle Vacche	Acuto	555	W	25	Calcare	346820	4629368
28	Tor	Lazio	Toro di Subiaco	Simbruini- Ernici Monti	Toro di Subiaco	Subiaco	970	-	-	Calcare	344656	4643816
29	San	Lazio	S.Maria dei Bisognosi	Simbruini- Ernici Monti	S.Maria dei Bisognosi	Subiaco	1070	-	-	Calcare	343696	4655615
30	mar	Lazio	Marcoro	Simbruini- Ernici Monti	Marcoro	Subiaco	887	-	-	Calcare	359257	4637936
31	Cas	Lazio	Monte S.Angelo	Simbruini- Ernici	Monte S.Angelo	Subiaco	221	-	-	Calcare	368811	4596554
32	Slo	Slovenia	Slovenia	Slovenia	Slovenia	Slovenia						
33	MV_01	Molise	Monte Vairano	Monte Vairano	Bosco Monte Vairano	Campobasso	900	NNE	15	Sedimenti elastici	468021,92	4599825,11
34	MV_02	Molise	Monte	Monte	Bosco Monte	Campobasso	879	S	40	Sedimenti	467331,23	4599552,51

35	MV_03	Molise	Vairano Monte Vairano Monte	Vairano Monte Vairano Monte	Vairano Bosco Vairano Monte	Monte	Campobasso	935	E	20	clastici Sedimenti clastici Sedimenti	466855,79	4599847,04
36	MV_04	Molise	Vairano Monte Vairano Monte	Vairano Monte Vairano Monte	Vairano Bosco Vairano Monte	Monte	Campobasso	789	N	30	clastici Sedimenti clastici Sedimenti	465055,36	4599487,32
37	MV_05	Molise	Vairano Monte Vairano Monte	Vairano Monte Vairano Monte	Vairano Bosco Vairano Monte	Monte	Campobasso	750	NE	30	clastici Sedimenti clastici Sedimenti	465495,68	4600867,44
38	MV_06	Molise	Vairano Monte Vairano Monte	Vairano Monte Vairano Monte	Vairano Bosco Vairano Monte	Monte	Campobasso	780	NE	25	clastici Sedimenti clastici Sedimenti	467826,75	4600632,75
39	MV_07	Molise	Vairano Monte Vairano Monte	Vairano Monte Vairano Monte	Vairano Bosco Vairano Monte	Monte	Campobasso	875	S	10	clastici Sedimenti clastici Sedimenti	468226,53	4599572,56
40	MV_08	Molise	Vairano Monte Vairano Monte	Vairano Monte Vairano Monte	Vairano Bosco Vairano Monte	Monte	Campobasso	710	NE	25	Calcare Sedimenti clastici Sedimenti	464916,39	4600352,13
41	MV_09	Molise	Vairano Bagnoli del Trigno	Vairano Bagnoli Trigno	Vairano Bosco Bagnoli	di	Campobasso	800	N	20	clastici Sedimenti clastici Sedimenti	466833,46	4600733,47
42	BT	Molise	del Trigno	Trigno	Bagnoli		Isernia	400	-	-	clastici Sedimenti clastici Sedimenti	454050,68	4617916,52

Tabella 4.1: Dati relativi alle stazioni di campionamento.

Una seconda parte del materiale vegetale (foglie), da cui è stato in seguito estratto il DNA, è stato conservato fresco in congelatore alla temperatura di  $-80^{\circ}\text{C}$  (campioni molisani) o disidratato in gel di silice (campioni laziali e pugliesi). Il DNA genomico è stato estratto seguendo il protocollo del “Kit di estrazione della Invisorb”, presso il laboratorio di Biologia Vegetale dell’Università del Molise. L’amplificazione con PCR multiplex su 12 loci e la genotipizzazione è stata effettuata presso i laboratori dell’Università del Molise, dell’INRA di Bordeaux (Francia) e presso i laboratori della Bio-Fab Research di Roma.

## 4.2 Le aree di campionamento

### 4.2.1 Molise

Il materiale raccolto è stato campionato all’interno del sito SIC IT7222295 “Monte Vairano” (CB), un’area con un’estensione di 675 ettari localizzata a 997 metri s.l.m. Sono stati campionati 273 individui in 9 plot (fig. 4.2) e il campionamento è stato effettuato sulle seguenti 3 specie simpatriche: *Q. frainetto*, *Q. petraea* e *Q. pubescens* (fig. 4.2). Sono inoltre stati campionati ed analizzati in Molise ulteriori 30 campioni di *Q. petraea* provenienti da un’area campione (bt) localizzata a Bagnoli del Trigno (IS) e utilizzati come confronto nelle analisi bayesiane.

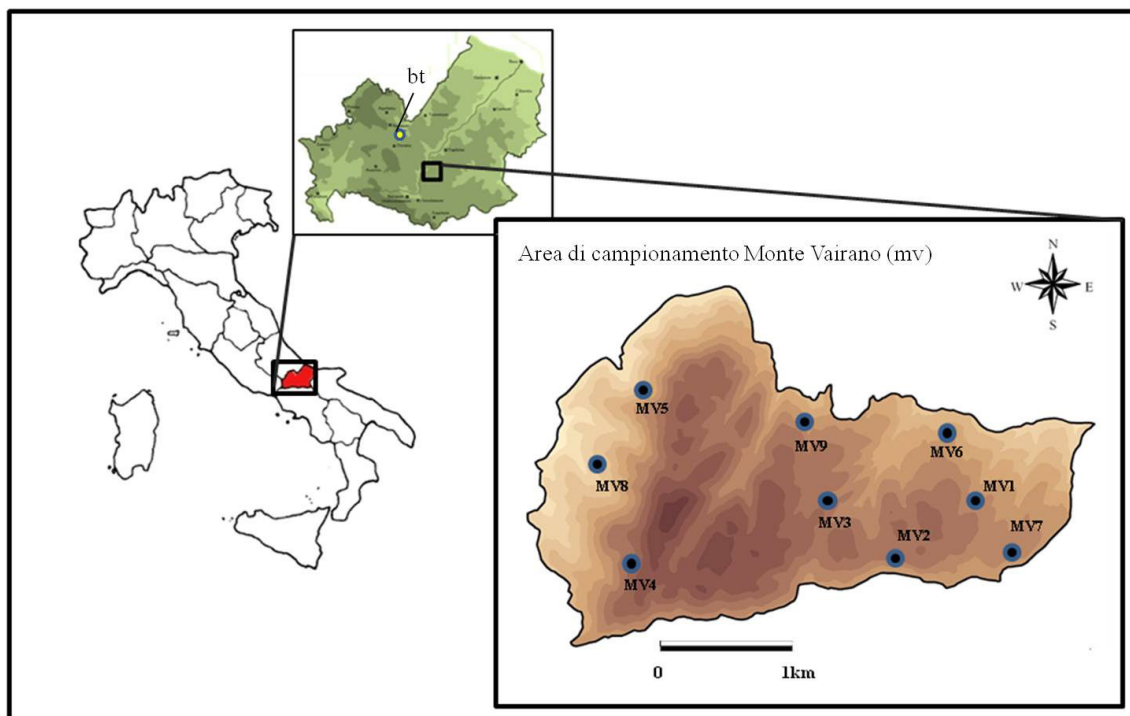


Figura 4.2: Distribuzione degli stand di campionamento in Molise.

#### 4.2.2 Lazio

I campioni laziali (210 individui) provengono da un campionamento effettuato in 7 plot di boschi di *Q. pubescens* nella provincia di Frosinone (tab. 4.1). L'area di studio ricade nel settore meridionale del Lazio, che si estende dalla costa tirrenica fino alla dorsale appenninica (fig. 4.3). L'indagine si è concentrata sulle dorsali calcaree che formano le unità dell'Antiappennino e dell'Appennino; in particolare i campioni provengono dai boschi dei Monti Ausoni ed Aurunci (Antiappennino) e quelle dei Monti Simbruini ed Ernici (Appennino).

Gli Stand di campionamento sono: COR- Monte Feuci - Coreno Ausonio (bosco ceduo di roverella); PDA - Pozzo d'Antullo – Colleparado (bosco ceduo di roverella con cerro e ginepro); ACU - Lestra delle Vacche – Acuto (bosco ceduo di roverella), TOR – Toro di Subiaco, Monti Simbruini-Ernici (bosco ceduo di roverella), SAN – Santa Maria dei Bisognosi, Monti Simbruini-Ernici (bosco ceduo di roverella), MAR – Marcoro, Monti Simbruini-Ernici (bosco ceduo di roverella) e CAS – Monte S'Angelo, Monti Simbruini-Ernici (bosco ceduo di roverella) (fig.4.3 - tab. 4.1).

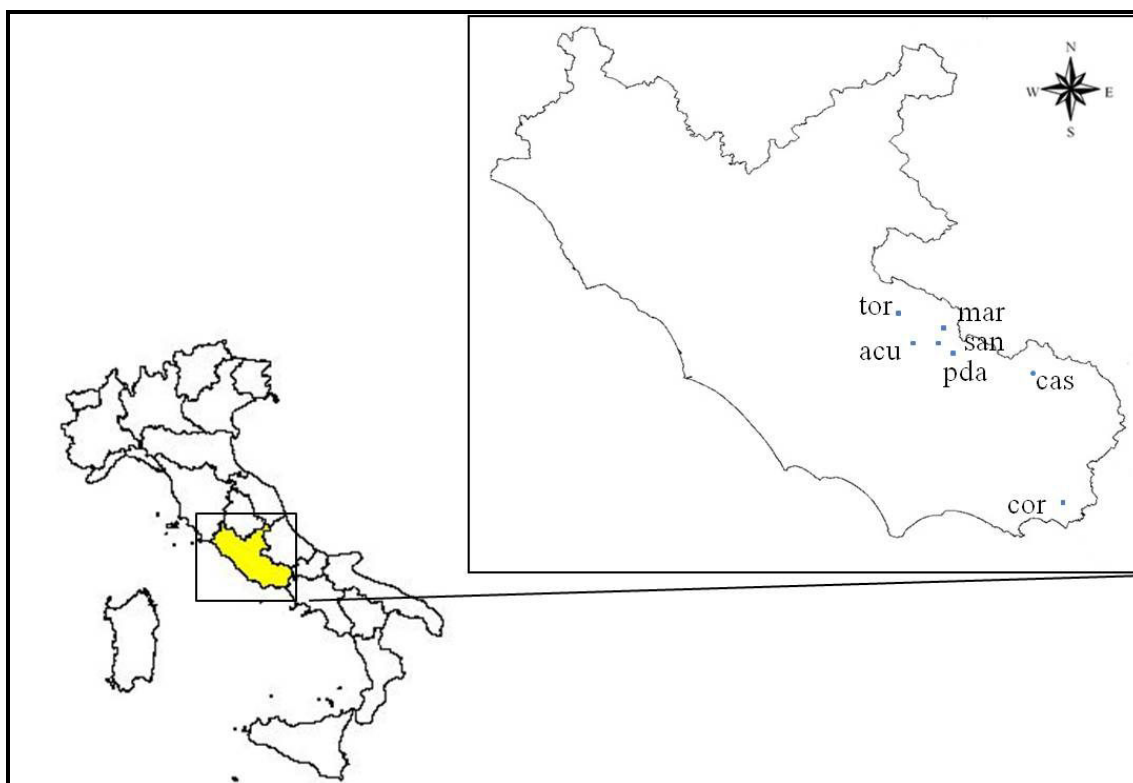


Figura 4.3: Distribuzione degli stand di campionamento in Lazio.

### 4.2.3 Puglia

I campioni pugliesi (379 individui) provengono da un campionamento effettuato in 24 stand di campionamento (fig. 4.4, tab.4.1). Gli stand sono stati individuati in boschi di *Q. pubescens* dislocati in diverse aree. Le aree di studio possono essere suddivise nelle seguenti macro aree di campionamento:

- Macroarea del Gargano: stand di campionamento n. 6 (Gargano- Chiancate), n. 5 (Cagnano Varano), n. 23 (Vico del Gargano) e n. 24 (Vico del Gargano - Caritate);
- Macroarea del sub-Appennino Dauno: stand di campionamento n. 2 (Sub-Appennino Dauno- Accadia), n. 7 (Consolazione – Deliceto), n. 8 (Sub-Appennino Dauno- Deliceto), n. 9 (Sub-Appennino Dauno- Difesa Coste), n. 12 (Tavoliere - Incoronata);
- Macroarea delle Murge: stand di campionamento n. 1 (Acquaviva – Bosco Mesole), n. 4 (Acquatetta – Spinazzola), n. 10 (Difesa Grande – Gravina di Puglia) , n. 11 (Laterza – Grottaturge), n. 13 (Jazzo Pagliara – Ruvo di Puglia), n. 14 (Lago Laterza – Tafuri), n. 15 (Lama del Lato – Castellaneta Marina), n. 17 (Bosco della Parata – Murge), n. 18 (Bosco della Pianella – Martina Franca), n. 19 (Quasano – Torriti), n. 20 (Sant'Eramo), n. 21(Sant'Eramo – strada.271 Cassano) e n. 22 (Selva San Vito – Laterza);
- Macroarea del Salento: stand di campionamento n. 3 (Costa di Brindisi – Bosco del Compare), n. 16 (Palmariggi) (tab. 4.1).

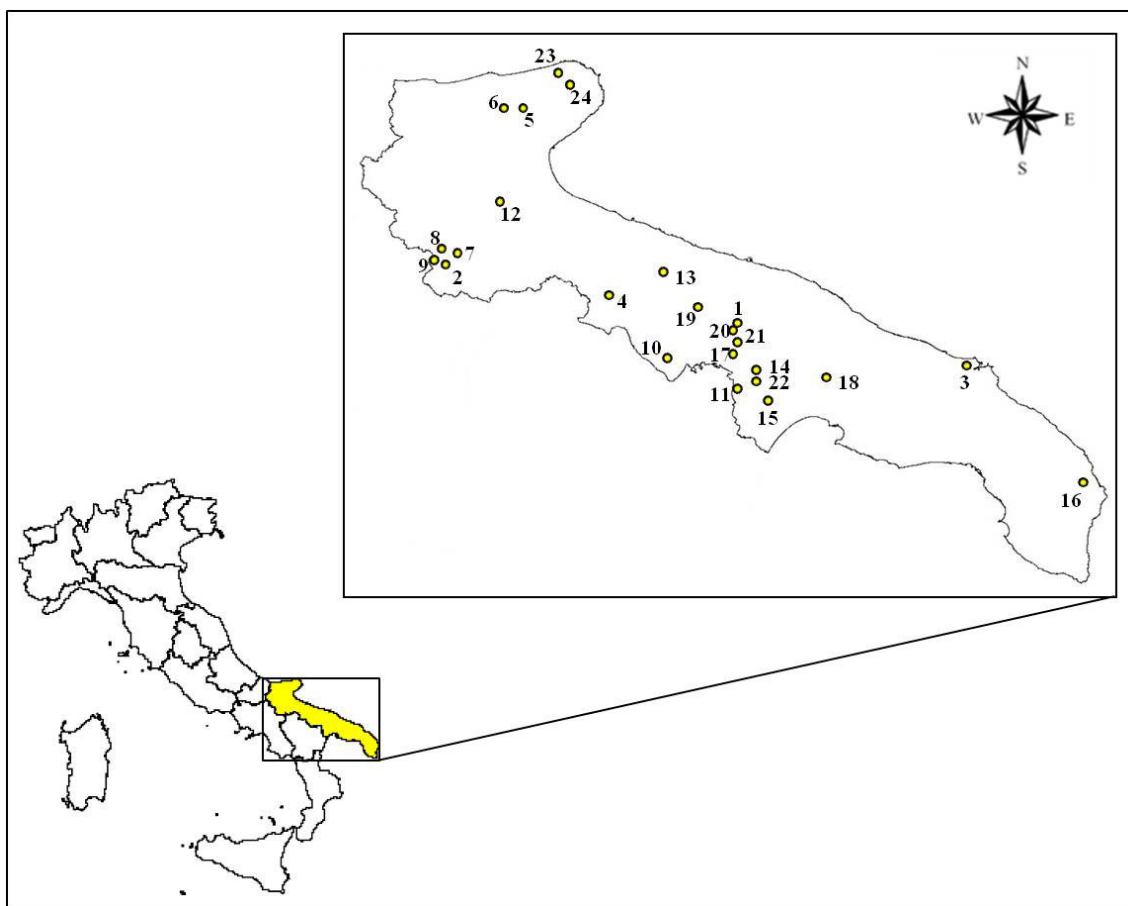


Figura 4.4: Distribuzione degli stand di campionamento in Puglia.

#### 4.3 Estrazione del DNA da foglie

Il DNA genomico è stato estratto dalle foglie dei campioni di querce seguendo il protocollo del kit di estrazione “Invisor<sup>®</sup> Spin Plant Mini Kit”. L'isolamento di DNA genomico con l'utilizzo del kit è effettuato incubando il tessuto in precedenza omogeneizzato con azoto liquido con una soluzione di lisi (Lysis Buffer). Il lisato è caricato su una “spin column”, una colonnina contenente resina, dove il DNA si lega alla membrana di silice, mentre il restante lisato è eliminato per centrifugazione. Dopo alcuni lavaggi (Wash Buffer steps) il DNA è eluito all'interno di un tubo di raccolta mediante un opportuno buffer (Elution Buffer). Questa tecnica permette l'estrazione del DNA senza l'utilizzo di solventi inorganici tossici come il fenolo e il cloroformio, inoltre presenta il principale vantaggio della velocità di applicazione in quanto il metodo spin column combina l'efficacia della cromatografia alla velocità della centrifugazione. La forza centrifuga costringe il passaggio del liquido attraverso la membrana: quanto più aumenta la forza  $g$  (velocità di centrifugazione), tanto più cresce la pressione attraverso la membrana. Nelle spin column, le proprietà di legame delle matrici e la velocità di micro centrifugazione combinate permettono una rimozione del 90-95% dei



contaminanti e un analogo recupero dei frammenti di DNA di dimensioni variabili a seconda del tipo di matrice impiegata. Le fasi di estrazione con “Invisor<sup>®</sup> Spin Plant Mini Kit” sono state le seguenti:

1. Omogeneizzazione del materiale di partenza:

sono state polverizzate 0,6 g di foglie per individuo in azoto liquido con l’ausilio di pestello e mortaio;

2. Lisi del materiale di partenza:

al materiale di partenza in polvere sono stati aggiunti 400 µl di Lysis Buffer P, 20 µl di Proteinasi K e poi è stata agitata vigorosamente la soluzione per sospendere il materiale vegetale; il campione è stato incubato in bagno riscaldato a 65°C per 30 min;

3. Filtrazione della soluzione lisata:

la soluzione viene trasferita nel prefiltra e centrifugata per 1 min a 12.000 rpm; sono stati aggiunti 200 µl di Binding Buffer P e agitata vigorosamente la soluzione;

4. DNA Binding:

la soluzione viene trasferita in uno spin filter, incubata e centrifugata per 1 min a 12.000 rpm e scartato il filtrato;

5. Washing I:

sono stati aggiunti 500 µl di Washing Buffer I, centrifugato per 1 min a 12.000 rpm e scartato il filtrato;

6. Washing II:

sono stati aggiunti 500 µl di Washing Buffer II, centrifugato per 1 min a 12.000 rpm, scartato il filtrato e ripetuta l’operazione; infine viene centrifugata la colonnina per 2 min a 12.000 rpm per rimuovere i residui di etanolo;

7. Eluizione del DNA:

l’ultimo passaggio consiste nell’eluire il DNA adesivo alla membrana dello spin filter con 100 µl di Elution Buffer preriscaldato; dopo l’incubazione di 3 min a T ambiente viene effettuata una centrifugazione per 1 minuto a 1000 rpm. Il DNA estratto è stato poi conservato a -20°C.

#### **4.4 Elettroforesi su gel di agarosio**

La presenza del DNA estratto è stata valutata mediante elettroforesi orizzontale su gel di agarosio. L’elettroforesi in gel è un metodo standard utilizzato per separare, identificare e purificare frammenti di DNA: è un processo elettrocinetico nel quale molecole e particelle cariche, in soluzione acquosa, sotto l’influenza di un campo elettrico, migrano in direzione del polo che ha carica opposta. La strumentazione necessaria a condurre una corsa elettroforetica

comprende un alimentatore e un apparato (camera elettroforetica) di tipo diverso, a seconda del supporto utilizzato. Esempi di apparati comunemente usati per corse elettroforetiche sono quello per elettroforesi verticale su gel di acrilamide, o quello per elettroforesi orizzontale su gel di agarosio.

La mobilità elettroforetica ( $\mu$ ) di una particella è pari al rapporto tra la sua velocità di migrazione e l'entità del campo elettrico applicato ( $V/E$ ).

La velocità di migrazione dipende a sua volta da diversi fattori:

- 3) Campo elettrico applicato;
- 4) Caratteristiche della particella quali massa, carica, dimensioni e forma;
- 5) Tipo di supporto utilizzato per eseguire la separazione;
- 6) Tampone utilizzato per la corsa;

La separazione elettroforetica su gel prevede che la miscela di molecole da separare sia caricata su di un supporto gelatinoso preparato a base di agarosio o poliacrilammide. L'agarosio è normalmente utilizzato per la separazione di frammenti di acidi nucleici aventi dimensioni tipicamente comprese tra 500 bp a 20 kb circa, con alcune variazioni nei dosaggi dell'agarosio, è possibile arrivare a separare anche frammenti parecchio più grandi. I gel di poliacrilammide sono invece più comunemente usati per la separazione di proteine e per frammenti di DNA più piccoli, da pochi nucleotidi a 2-3 kb circa. La miscela campione da separare va sciolta in un tampone, con il quale va anche saturato il mezzo gelatinoso di supporto per consentire la conduzione della corrente, che si genera quando fra i due elettrodi viene applicata una differenza di potenziale. La soluzione ottenuta si versa in uno stampo dove avviene la gelificazione e dove, con un pettine verranno ricavati gli spazi per depositare i campioni. Il gel viene poi immerso completamente nel tampone. Il campo elettrico generato fa sì che le componenti del campione migrino in una direzione (verso l'anodo nel caso degli acidi nucleici) in base alla loro carica, con velocità che dipende anche dalla loro forma e dimensione, oltre che dall'intensità di corrente. L'agarosio è un polimero di carboidrati estratto dalle alghe, se fuso e gelificato, forma una matrice, la cui porosità dipende dalla concentrazione dell'agarosio utilizzato. La molecola del DNA è caricata negativamente e, se sottoposta ad elettroforesi, migra verso il polo positivo della camera elettroforetica. La matrice porosa del gel ritarda la migrazione del DNA all'interno di esso, consentendo ai piccoli frammenti di spostarsi più velocemente rispetto ai più grandi. Il risultato è che i frammenti di DNA si separeranno nella matrice in funzione del peso molecolare e della forma (superelica, circolare o lineare). Elevate concentrazioni di gel di agarosio si usano per separare

le molecole più piccole e, viceversa, concentrazioni più basse sono più adatte a separare frammenti più grandi. Per consentire la visualizzazione del DNA migrato il gel viene colorato con bromuro di etidio. Il bromuro di etidio è molecola planare che si intercala tra le basi dell'acido nucleico a doppio filamento e quando è legato al DNA emette luce fluorescente se irradiata con luce ultravioletta; ciò è dovuto al fatto che questa molecola ha uno spettro di eccitazione della fluorescenza con un massimo a 302 nm e presenta una fluorescenza circa 10 volte maggiore rispetto alla molecola del bromuro di etidio libero. Dopo la corsa elettroforetica, un transilluminatore consente la visualizzazione del DNA genomico come una singola banda di elevato peso molecolare e l'immagine può essere registrata fotografandola su film o acquisita con appositi programmi. La sensibilità del rilevamento è solitamente superiore a 0.1 µg di DNA e l'intensità della banda è proporzionale alla concentrazione.

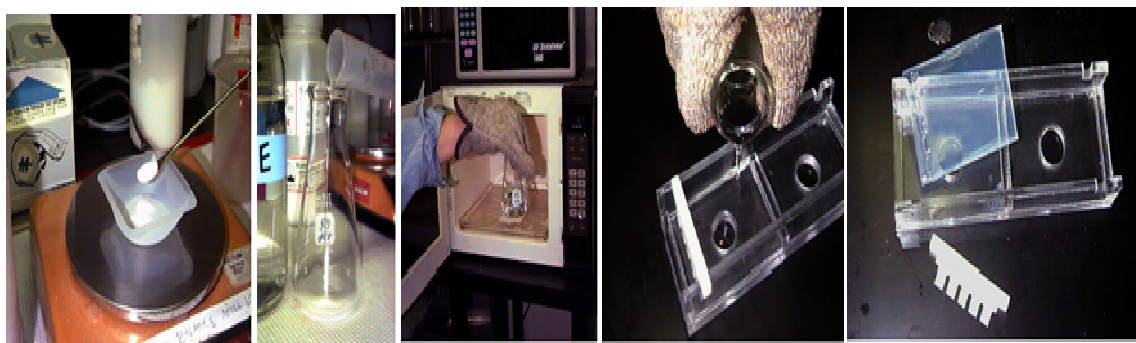


Figura 4.5: Fasi della preparazione del gel di agarosio.

Il confronto con un marcatore di peso molecolare noto, permette la stima del DNA estratto per ciascun campione. Per sciogliere l'agarosio è stata utilizzata la soluzione tampone TAE che consente al DNA di muoversi uniformemente lungo il gel ed ha lo scopo di determinare e mantenere stabili il pH e la concentrazione di ioni del gel. Il gel è stato preparato con agarosio all'1% sciolto in 50 ml di TAE 1X (48,4 mM Tris base, 11,42 mM acido acetico glaciale e 20 mM EDTA) in presenza di 2,5 µl di bromuro di etidio. Dal momento che l'agarosio non è solubile a temperatura ambiente, viene portato ad ebollizione in forno a microonde (Fig.4.5). Successivamente viene aggiunto il bromuro di etidio e versata la soluzione su una piastra con supporto e pettine. Quest'ultimo serve a realizzare i pozzetti in cui caricare la soluzione contenente il DNA costituita da 10 µl di H<sub>2</sub>O, 3 µl di buffer 6x e 5 µl di campione di DNA estratto. Lo standard di riferimento (Lambda DNA, Promega) viene caricato in un pozzetto centrale e fatto correre insieme al gel (Fig.4.7.a). Il gel viene quindi sistemato nella camera di elettroforesi e la corsa avviene in tampone di elettroforesi TAE 1X a 120 V. Dopo aver rimosso il gel dall'apparecchio di elettroforesi, il DNA è stato visualizzato mediante

esposizione agli UV (Fig.4.6).

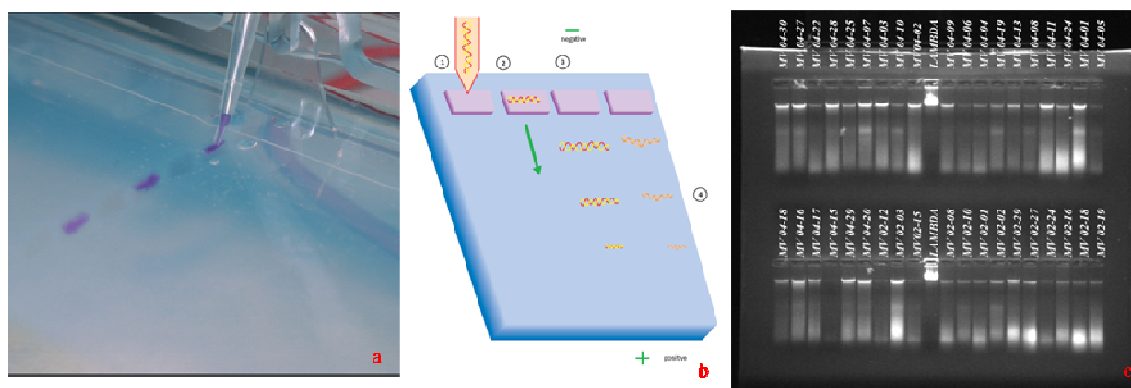


Figura 4.6: a: Aggiunta della soluzione contenente DNA al gel di agarosio con l'utilizzo di una pipetta.  
b: (1) frammenti di DNA caricati su gel. (2) applicazione del campo elettrico e spostamento del DNA caricato negativamente verso l'elettrodo positivo. (3) Frammenti più piccoli di DNA fragments si muovono più velocemente attraverso il gel. (4) Il DNA è migrato rivelando la sua posizione.  
c: visualizzazione del DNA estratto mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio.

#### 4.5 Quantificazione del DNA

La quantificazione del DNA è stata effettuata con metodo spettrofotometrico mediante l'utilizzo dello spettrofotometro ad 8 pozzetti NANODROP-8000 Thermoscientific con un quantitativo 2  $\mu$ l di soluzione contenente DNA a concentrazione sconosciuta. La quantificazione del DNA con il metodo spettrofotometrico sfrutta la capacità degli acidi nucleici di assorbire la luce UV in uno spettro di assorbimento da 230 nm a 280 nm con un massimo di assorbimento ad una lunghezza d'onda di 260 nm. La misura di assorbanza a 260 indica la presenza di acidi nucleici mentre la misura dell'assorbanza a 280 indica la presenza di impurezza (soprattutto proteine). Un valore di A260/A280 compreso tra 1.8 e 2 indica una buona purezza del DNA. L'assorbanza a 230 nm riflette la presenza di contaminazione nel campione dovuta a sostanze come carboidrati, fenoli, peptidi o composti aromatici. Per campioni puri il rapporto A260/A230 dovrebbe essere circa 2.2. La misura della concentrazione ed i rapporti A260/A230 ed A260/A280 (indici di purezza del DNA) sono stati restituiti con il software ND-8000v2.1.0 (tab.1 "Quantification of DNA concentration NANODROP-8000 Thermoscientific", appendice). Quantificato il DNA, si è proceduto alla diluizione con dei campioni per portarli alla stessa concentrazione di 10  $\mu$ l/ml. Questa fase di preparazione dei campioni è stata automatizzata mediante l'uso della stazione robotizzata MicroLab Starlet Hamilton. I quantitativi dei dosaggi relativi alle diluizioni sono riportati in appendice, tab.2 "Model Dilution DNA by MicroLab Starlet Hamilton".

#### 4.6 Amplificazione dei microsatelliti

Per raggiungere le condizioni di amplificazione PCR in *multiplex* ottimali, e per verificare la

compatibilità in termini sia di dimensione dei frammenti, che di *performance* di ogni *locus*, sono stati effettuati dei test presso i laboratori dell'INRA di Bordeaux. Successivamente sono stati amplificati tutti i 905 campioni del DNA. Il protocollo scelto (Guichoux *et al.*, 2011) per l'amplificazione dei frammenti di DNA è stato messo a punto selezionando microsatelliti altamente differenziati tra *Quercus robur* e *Q. petraea* (Lepais *et al.*, 2006 - tab.4.2). I primer utilizzati per l'amplificazione contemporanea di 12 *loci* microsatellite sono marcati con 4 fluorofori ad emissione di luce blu (6-FAM), verde (VIC), rossa (PET) e gialla (NED) così da poter distinguere alleli sovrapposti con la diversa marcatura tramite un metodo di rilevazione multicolore, mentre il reverse non è marcato. Perché la reazione avvenga in PCR multiplex sono necessarie le seguenti componenti specifiche:

- i tratti DNA che si vogliono amplificare, di cui si conoscono le sequenze terminali;
- le coppie di primer a singolo filamento che identificano le regioni da amplificare;
- i nucleotidi trifosfati (dNTPs);
- l'enzima Taq polimerasi;
- il buffer di reazione che contiene i cofattori necessari a rendere ottimale l'amplificazione;

Locus	Primer sequences (5'-3')	Reference	LG	Dye	[C]	Motif	Size (bp)	A	H <sub>o</sub>	F <sub>IS</sub>	F <sub>ST</sub>
PIE020	GCAGAGGCTCTTCTAAATACAGAACT GGGAGGTTTCTGGGAGAGAT	Durand <i>et al.</i> 2010	1	FAM	1.00	AG	97-119	11	0.668	-0.002	0.018
PIE223	TAGAAGCCCAACACGGCTAC AGCAAAACACAAACGCACAA	Durand <i>et al.</i> 2010	2	FAM	1.00	GGT	197-221	9	0.749	-0.057	0.108
PIE152	TGTACCTCTTCTCTCTCTAAAAC GAATTCTAAACACTAGCATTGAC	Durand <i>et al.</i> 2010	2	FAM	3.75	TA	230-260	15	0.842	-0.024	0.032
PIE242	TGGAGGGAAAAGAACAATGC TTGCAATCCTCCAAATTTAATG	Durand <i>et al.</i> 2010	3	VIC	1.00	TA	102-128	12	0.803	0.045	0.038
PIE102	ACCTTCCATGCTCAAAGATG GCTGGTGATACAAGTGTGG	Durand <i>et al.</i> 2010	11	VIC	0.50	CT	131-161	9	0.722	-0.047	0.008
PIE243	GGGGTCAGTAGGCAAGTCTTC GAGCTGCATATTTCTTAGTCAG	Durand <i>et al.</i> 2010	10	VIC	0.25	AG	208-222	6	0.151	0.677	0.070
PIE239	TCAACAAATGGCTCAACAGTG CCCATTGGTAGCAAAGAGTC	Durand <i>et al.</i> 2010	NA	PET	0.63	AT	70-83	11	0.590	-0.082	0.159
PIE227	TACCATGATCTGGAAGCAAC AAGGGCTTGGTTGGTTAGT	Durand <i>et al.</i> 2010	NA	PET	0.38	TGG	156-177	5	0.546	-0.064	0.207
PIE271	CACACTACCAACCTACCC GTGCGGTGTAGACGGAGAT	Durand <i>et al.</i> 2010	2	PET	0.50	TC	180-197	10	0.759	0.019	0.021
PIE267	TCCAACCATCAAGGCCATTAC GTGCGAACAGATCCCTTGTC	Durand <i>et al.</i> 2010	3	NED	0.25	AG	80-105	10	0.824	-0.038	0.015
PIE258	TTCTCGATCTCAAAACAAACCA TTTGATTGTTTAAGGAAAATTGGA	Durand <i>et al.</i> 2010	2	NED	0.75	TC	128-159	19	0.880	0.005	0.039
PIE215	TACGAAATGGAGCTGTTGACC TCTCCTTCTTCTGCCATGA	Durand <i>et al.</i> 2010	12	NED	0.30	GAG	188-206	6	0.553	0.036	0.125

Tabella 4.2: Elenco degli microsatelliti SSR utilizzati per la PCR multiplex e loro caratteristiche (Guichoux *et al.*, 2011). La tabella riporta il nome del *locus*, la sequenza dei primers, il fluoroforo con cui sono stati marcati tutti i primers forward (dye) il motivo, il numero di alleli (A), la taglia (bp) la concentrazione, ed i valori Ho, Fis e Fst.

Le tappe fondamentali della reazione di amplificazione sono:

- la denaturazione a 95°C del DNA che si separa in due filamenti;
- la fase di annealing o appaiamento, in cui i primer complementari alle sequenze di interesse si legano. Questa fase avviene alla temperatura caratteristica di ogni coppia di primer;
- l'estensione, in cui, grazie alla presenza dei nucleotidi, i primer si allungano ed avviene la sintesi di numerose copie del frammento di interesse;

Queste tre fasi possono essere ripetute n volte, portando così all'amplificazione esponenziale della regione di interesse.

Scongelati i primers e' stata preparata la primer mix dei 12 microsatelliti con 353,6 µl di primers (vedi quantitativi tabella 2) e 446,4 µl di acqua ultrapura milliQ.

Il buffer di reazione della PCR multiplex per un campione contiene:

- 3 µl di DNA 10 ng/µl
- 1,25 µl di Primer mix
- 4 µl 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (6 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.7 (20°C), dNTP Mix, HotStarTaq DNA Polymerase)
- 4,25 µl di acqua ultrapura milliQ

La reazione di amplificazione è stata effettuata con il termociclatore MJResearch DNA Engine Tetrad2-4 (Biorad) in piastre di polipropilene a 96 pozzetti (ABgene PCR plates AB-800) coperte con fogli adesivi (AB-0558) per evitare l'evaporazione della soluzione durante la PCR. Le fasi e le condizioni di temperatura impostate per la PCR Multiplex effettuata sono:

	temperature	time	cycles
Denaturation	95°	15mn	1
Annealing	94°	30 sec	30
Elongation	56°	60 sec	
Extension	72°	45 sec	
Final extension	60°	30 mn	1

Tabella 4.3: Parametri utilizzati nella PCR.

Terminata la PCR è stato effettuato un controllo su 8 campioni per piastra per verificare che l'amplificazione fosse avvenuta correttamente. Il controllo è stato fatto su gel d'agarosio al 2% tramite elettroforesi orizzontale. Per la corsa è stato utilizzato uno standard di riferimento del peso molecolare 1 kb. I campioni amplificati sono stati miscelati con blue di bromofenolo nelle seguenti dosi:

- 4 µl di prodotto della PCR
- 2 µl di blue di bromofenolo

Il gel di agarosio è stato preparato con:

- 50 ml di TAE 1X + 1g di agarosio
- 1 µl di gel red

Solidificato il gel, sono stati caricati nei pozzetti i campioni di DNA amplificato e in un pozzetto centrale lo standard di riferimento. I campioni sono stati fatti migrare a 100 V per 25 min.

#### **4.7 Genotipizzazione**

La genotipizzazione è stata effettuata mediante la tecnica semi-automatizzata dell'elettroforesi capillare ("High Performance Capillary Electrophoresis" o HPCE) usando un sequenziatore modello ABI-3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). L'elettroforesi capillare è una tecnica che permette la separazione di un'ampia gamma di composti biologici (come proteine, peptidi, aminoacidi, acidi nucleici...), mediante migrazione differenziata di molecole elettricamente cariche in uno specifico tampone all'interno di capillari in silice fusa. Il funzionamento semplificato di una apparecchiatura per elettroforesi capillare è il seguente: una piccola quantità di soluzione contenente il campione (tra 1 e 50 nl) viene iniettata nel capillare, che contiene un buffer appropriato, dall'estremità anodica. Per effettuare la separazione viene applicata una differenza di potenziale tra le due estremità del capillare. All'interno del capillare, oltre all'attrazione dei poli sulle molecole di segno opposto, si ha un flusso elettrosmotico (EOF) verso il catodo. Il flusso elettrosmotico nel capillare è caratterizzato dal profilo piatto che fa sì che non contribuisca direttamente alla dispersione del soluto. L'EOF causa la migrazione di tutte le specie, indipendentemente dalla carica, nella stessa direzione, cioè verso il catodo. Anche gli anioni migreranno tutti verso il catodo dal momento che il flusso elettrosmotico è più grande, di almeno un ordine di grandezza, della loro mobilità elettroforetica. Quindi, anioni, cationi ed elementi neutri in un capillare migrano tutti nella stessa direzione quando sottoposti a elettroforesi. L'elettroforesi avviene all'interno di un tubo (capillare) stretto, il cui piccolo volume interno limita la quantità di calore generato. La sequenza delle bande di DNA marcato viene visualizzata in un unico grafico detto elettroferogramma, caratterizzato da una successione di picchi di quattro colori diversi, che corrispondono alle emissioni fluorescenti dei diversi fluorocromi, ogni volta che i vari frammenti di diversa lunghezza nucleotidica raggiungono, lungo la corsa elettroforetica, la posizione del rilevatore (fig. 4.7).



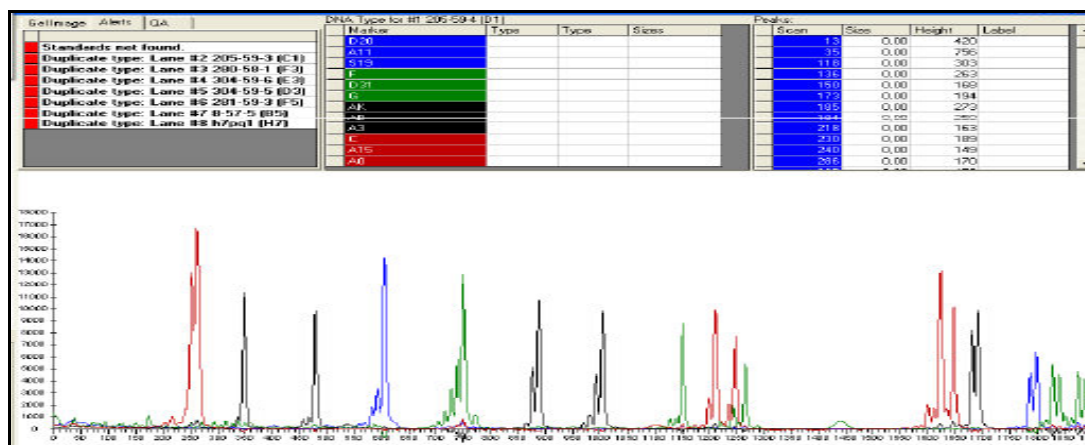


Figura 4.7: Esempio di elettroferogramma.

Il protocollo seguito per poter effettuare l'elettroforesi capillare ha previsto la precedente diluizione 1:40 dei prodotti di PCR. Durante la fase di test i prodotti di PCR sono stati diluiti 1:20 e 1:40 e, dall'analisi preliminare dei risultati del test, si è optato di effettuare una diluizione 1:40 per tutti i 905 campioni poiché maggiormente confrontabili con lo standard di riferimento utilizzato. Da una mix di 1 ml di formammide (Applied Biosystems) e 10 µl di size standard (GeneScan – 600 LIZ Size Standard, Applied Biosystems) sono stati prelevati 10 µl di soluzione ed aggiunti con un dosatore volumetrico a 2 µl di prodotto della PCR diluito 1:40. Le piastre sono state caricate sul sequenziatore automatico a capillari previa denaturazione con termociclatore (2 minuti a 96°C). La formammide è indispensabile in quanto permette la denaturazione del DNA precedentemente amplificato mentre il 600 LIZ Size Standard è lo standard di riferimento (fig.4.8) utilizzato costituito da un pool di frammenti fluorescenti, di dimensioni note, che fornisce la scala di taratura utile nell'analisi successiva dei dati. Nel sequenziatore i campioni migrano in presenza di una forza elettroforetica secondo il loro peso molecolare; durante la migrazione i frammenti, grazie alla presenza di un sensore, vengono rilevati e ne vengono lette le dimensioni.

L'analisi delle dimensioni dei frammenti di DNA viene fatta in prima battuta usando i software Peak Scanner TM 1.0 (Applied Biosystems) e STRand (University of California), per essere poi rivista manualmente. I programmi hanno permesso un'ispezione visiva di ogni frammento amplificato di un *locus* microsatellite nella ricerca di alleli. Ogni frammento è stato visualizzato in un grafico avente per ascissa il tempo di migrazione su gel e per ordinata l'intensità del prodotto amplificato. L'informazione contenuta nei vari picchi (taglia e quantità dei frammenti di DNA) viene convertita in un linguaggio comune per permettere il confronto dei dati. Il set finale di alleli individuati per ciascun marcatore viene quindi esportato per ulteriori analisi.



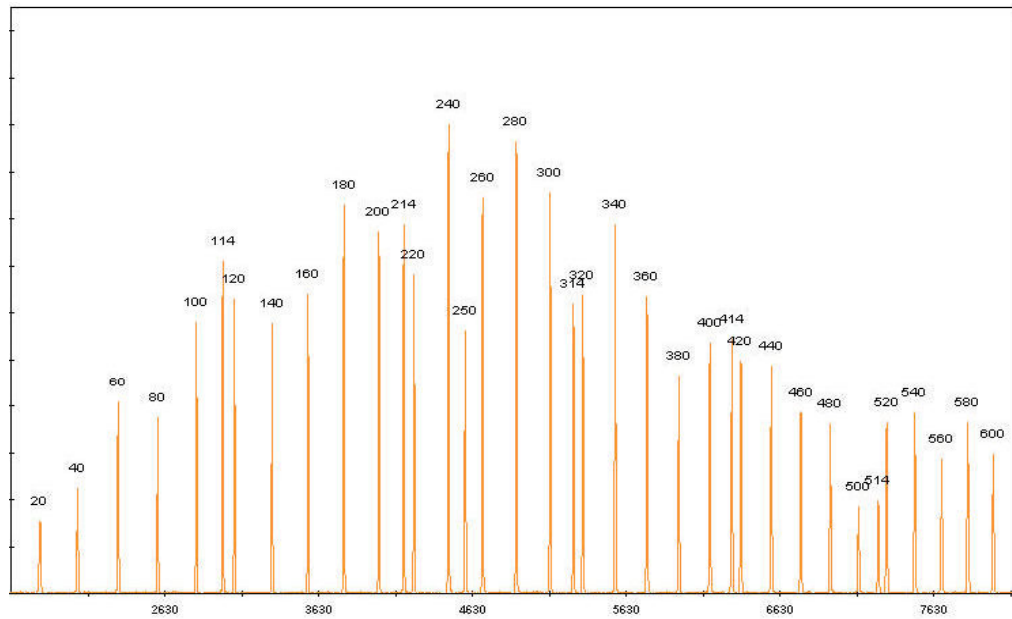


Figura 4.8: Elettroferogramma dello standard di riferimento 600 LIZ Size Standard.

#### 4.8 Il Binning e la fase di assegnazione allelica

In questa fase è stata effettuata, con assegnazione allelica manuale, ossia la determinazione del genotipo di tutti i frammenti di DNA genotipizzato. Gli alleli di tutti gli individui sono stati identificati in base alla loro dimensione, espressa in paia di basi (bp). Durante questa fase si è dovuto tener conto degli errori sperimentali a cui questo metodo è soggetto quali:

- l'errore dovuto al fatto che la lunghezza degli alleli misurata è influenzata dalla velocità di migrazione del frammento che a sua volta è legata al contenuto in GC mostrando una periodicità che si avvicina, ma che non è uguale all'unità di repeat (Amos *et al.*, 2007);
- errori dovuti al fatto che la lunghezza stimata del frammento può variare da esperimento a esperimento a causa della variazione stocastica della temperatura ambientale e della differente qualità della matrice di separazione (Guichoux *et al.*, 2011b);
- errori indotti da presenza nel DNA di composti che interferiscono con la PCR (Guichoux *et al.*, 2011b);
- errori della polimerasi (aggiunta di basi A) (Guichoux *et al.*, 2011b).

Gli errori sopra descritti sono legati al fatto che i dati grezzi delle lunghezze dei frammenti sono restituiti dal software in decimali e devono essere trasformati in numeri interi che rappresentano classi alleliche distinte. Ciò prevede la necessità di correzioni manuali in quanto questi errori sperimentali possono compromettere la fase di *allele calling* e del successivo binning, con la conseguente propagazione degli errori stessi (Guichoux *et al.*,

2011b). Il binning (o *allele calling*) è il processo di assegnazione di un numero intero (taglia dell'allele) a un valore continuo di lunghezza del frammento ottenuto dal sequenziatore. Errori introdotti durante il binning si ripercuotono in generale sulla stima e il calcolo delle frequenze alleliche distorcendo parametri chiave come l'eterozigosità (Amos *et al.*, 2007). Con i programmi utilizzati (Peakscanner e STrand) può essere effettuato un binning automatico, ma non è possibile definire automaticamente i limiti delle dimensioni di ciascun allele, per questo motivo, si è resa necessaria, in questa fase, un binning manuale che ha permesso uno scrupoloso controllo della taglia di tutti gli alleli analizzati dal sequenziatore. Sono quindi stati separati i profili dei singoli frammenti di DNA amplificato di tutti i campioni (fig. 4.9), esaminati e, successivamente, è stato possibile effettuare il dimensionamento manuale degli alleli di ogni *locus* (fig.4.10 e fig. 1-10 allegato). Creare in questo modo i bins ha permesso di applicare una strategia di minimizzazione degli errori di scoring a diversi stadi della genotipizzazione, dall'amplificazione alla correzione del *data set* finale.

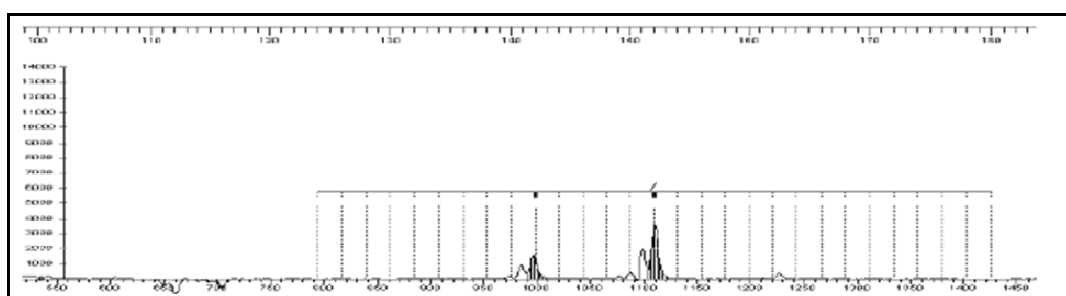


Figura 4.9: Assegnazione allelica manuale dell'SSR Pie102 per un campione.

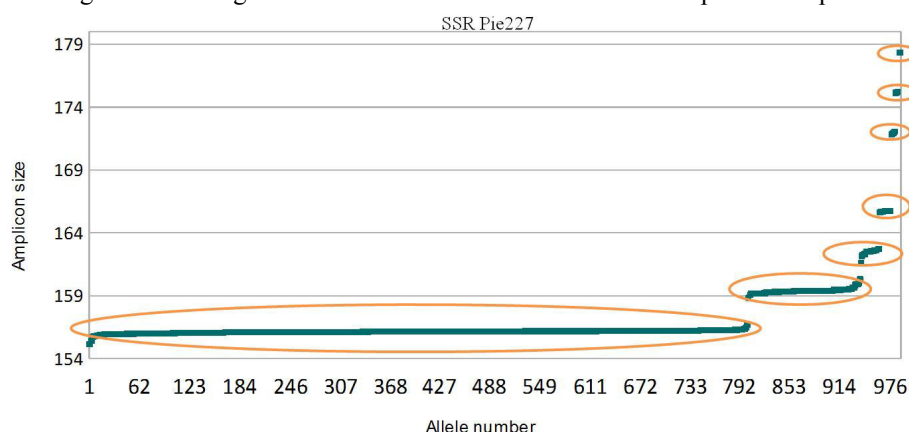


Figura 4.10: Grafico ottenuto per l'SSR Pie227: sono stati rilevati 7 gruppi di alleli. La taglia delle 'classi' alleliche si differenzia con dei veri e propri salti dimensionali mostrando, in questo caso, 7 forme alleliche distinte.

## 4.9 Elaborazione statistica dei dati

Le analisi statistiche dei dati sono state effettuate in più fasi e mediante più metodi. Nella prima fase sono stati individuati i cluster (gruppi) costituiti da individui con genotipo simile

(analisi probabilistica Bayesiana) ed è stata calcolata la probabilità di ogni individuo di appartenere ad una specie pura o di essere un ibrido. Mediante l'analisi della varianza molecolare (AMOVA) è stato studiato il grado di differenziazione genetica tra le specie ( $F_{st}$ ,  $R_{st}$ , ecc.) e la ripartizione della variabilità genetica complessiva tra le specie e le popolazioni. L'Analisi delle Componenti Principali (PCA) è stata effettuata per visualizzare l'ordinamento dei dati nello spazio multivariato sintetizzante la gran parte della varianza genetica complessiva (PC1 e PC2) e quindi utile per visualizzare i rapporti di somiglianza genotipica tra gli individui campionati. Infine, le relazioni filogenetiche tra le specie, le popolazioni e gli individui sono state studiate mediante analisi di classificazione (cluster analysis) su matrici di distanza genetica, che ha portato all'estrapolazione di alberi filogenetici.

Nel dettaglio le metodologie usate sono:

- Metodi Bayesiani.
- Metodi basati sulle distanze genetiche.

#### **4.9.1 Metodi Bayesiani**

Questi metodi utilizzano algoritmi basati su metodi statistici Bayesiani (Rannala e Mountain 1997). I metodi Bayesiani utilizzano particolari funzioni di probabilità per stimare le frequenze alleliche delle popolazioni di riferimento a partire dalle frequenze osservabili nel campione. L'attribuzione viene fatta calcolando la probabilità marginale di osservare il genotipo degli individui ignoti all'interno di ciascuna delle popolazioni di riferimento in base alle frequenze alleliche stimate. Il metodo Bayesiano utilizzato nella presente ricerca è quello implementato nel software *structure* (Pritchard et al. 2000; <http://pritch.bsd.uchicago.edu>). L'algoritmo definisce il numero di popolazioni di riferimento, ciascuna caratterizzata da un insieme di frequenze alleliche e poi assegna ogni individuo in maniera probabilistica. Il risultato che si ottiene è la probabilità a posteriori che un individuo "i" appartenga alla popolazione Z (sconosciuta) dato il genotipo X e stimate le frequenze alleliche P di tutte le popolazioni ( $\Pr(X|Z, P)$ ). La probabilità a priori, cioè la probabilità che un individuo appartenga ad una qualsiasi delle k popolazioni di riferimento, è definita come  $1/k$ . Il software consente l'analisi dei dati provenienti da marcatori dominanti utilizzando il "*no admixture model*" (ogni individuo è ipotizzato appartenere in maniera discreta a una determinata popolazione) e permette di scegliere il numero di simulazioni (burn-in period) con il quale minimizzare gli effetti dati dalla configurazione casuale di partenza, e il numero di routine MCMC (Markov Chain Monte Carlo) per la stima dei parametri Z e P, e per il calcolo delle probabilità a posteriori  $\Pr(X|Z, P)$ . È possibile inoltre indicare il numero delle popolazioni di

riferimento comprese nel dataset.

#### 4.9.2 Metodi basati sulle distanze genetiche

L'assegnazione di un individuo sconosciuto ad una certa popolazione può essere effettuata utilizzando misure di distanze genetiche che misurano la differenza genetica fra le popolazioni confrontando le frequenze alleliche tenendo conto di tutti i loci analizzati. Il metodo prevede la costruzione di una matrice di distanze tra le possibili coppie di individui e l'attribuzione viene poi eseguita sulla base della distanza tra l'individuo da assegnare e la media delle distanze tra i soggetti delle popolazioni di riferimento. Queste metodologie sono applicabili con facilità a numerose classi di marcatori e sono in grado di fornire risultati di semplice interpretazione che possono venire rappresentati graficamente applicando analisi multivariate o algoritmi che costruiscono alberi filogenetici. Hanno però lo svantaggio di essere dipendenti dal tipo di distanza utilizzata e dal sistema adottato per la sua rappresentazione grafica. Inoltre, il calcolo di intervalli di confidenza è complesso, non è possibile associare una probabilità al risultato ottenuto ed è difficile integrare informazioni aggiuntive come ad esempio la provenienza geografica (Cornuet *et al.*, 1999). Una misura di distanza che può essere usata in questo caso è ovviamente  $F_{ST}$  calcolato per ogni coppia possibile di popolazioni, ma più spesso vengono usate altre distanze. Una delle distanze genetiche più utilizzate è la distanza genetica di Nei:

$$D = -\log(I)$$

Dove:

$$I = \frac{J_{xx}}{n}$$

e  $J_{xx} = \sum p_{ix}^2$ ,  $J_{xy} = \sum p_{ix} p_{iy}$  e  $p_{ix}$  è la frequenza dell'allele  $i$  nella popolazione  $X$ .

Di solito il lavoro consiste nel calcolare una matrice di distanze genetiche in cui ogni popolazione viene confrontata con tutte le altre. Dalle matrici di distanze genetiche si procede poi a costruire un albero filogenetico che ricostruisce e rappresenta in modo grafico le differenze genetiche misurate.

##### 4.9.2.1 AMOVA

L'analisi della varianza molecolare (AMOVA) è una procedura statistica importante e relativamente recente che permette di dividere gerarchicamente la variazione genetica intra- e inter-specifica, e di effettuare test statistici (F-statistics). Le caratteristiche dell'AMOVA sono importanti, perché tale analisi è supportata per molti tipi di marcatori genetici ed offre la prova statistica da permutazione casuale.

Il tipo di dati e la scelta della distanza da calcolare, con l'AMOVA possono condurre ad

analisi relativamente differenti. È possibile valutare le differenze tra i gruppi mediante i valori di  $F_{st}$ ,  $R_{st}$  e  $\Phi_{PT}$ .  $F_{st}$  è calcolato come la proporzione di varianza tra popolazioni, in relazione alla varianza totale (distanza Codom-Allelic).

La stima di  $\Phi_{PT}$  (distanza Codom-Genotypic), analogo a  $F_{st}$ , permette di eliminare la varianza nelle popolazioni e di calcolare la differenziazione di popolazione sulla base della varianza genotipica.  $R_{st}$  (distanza Codom-Micros) ha lo stesso senso di  $F_{st}$ ,  $\Phi_{PT}$ , con eccezione che  $R_{st}$  può essere stimato solo via AMOVA e per dati microsatelliti (SSR). Nel presente studio l'AMOVA è stata effettuata con il software GenAlEx versione 6.4 (Peakall and Smouse, 2006).

#### 4.9.2.2 Analisi delle Componenti Principali (PCA)

Un modo di comprimere l'informazione all'interno dei dati, in maniera tale da conservare la maggior parte dell'informazione utile e di ottenere un'immediata visualizzazione dei dati stessi; oltre che di analizzare i cambiamenti di una variabile rispetto alle altre (ovvero a come le variabili co-variano), è data dalla PCA. Essa infatti permette di ottenere diverse informazioni: valutare la correlazione tra le variabili e la loro rilevanza; visualizzare gli oggetti (clusters, outliers, etc.); sintetizzare la descrizione dei dati (eliminazione del rumore o informazione spuria); ridurre la dimensionalità dei dati; ricercare proprietà principali; definire un modello di rappresentazione dei dati in uno spazio ortogonale (Viscosi, 2007). L'analisi delle componenti principali si propone di identificare a partire dai dati delle “direzioni” privilegiate, tali che lungo di esse si concentri la maggior parte dell'informazione presente. In questo modo, il numero di queste nuove variabili (componenti principali) da utilizzare per descrivere i dati sarà significativamente minore del numero di variabili iniziali. Ognuna delle componenti principali è una combinazione lineare delle variabili sperimentali:

$$PC1 = a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + \dots + a_{1c}x_c$$

$$PC2 = a_{21}x_1 + a_{22}x_2 + \dots + a_{2c}x_c$$

$$PCn = a_{n1}x_1 + a_{n2}x_2 + \dots + a_{nc}x_c$$

Da un punto di vista grafico, questo tipo di costruzione è equivalente a ruotare gli assi dello spazio n-dimensionale tenendo fermi i punti (campioni). I coefficienti assegnati a ciascuna variabile nella definizione delle componenti principali sono calcolati in maniera da massimizzare la varianza lungo quella direzione (Viscosi, 2007). Più precisamente si calcola la direzione lungo la quale si ha la massima varianza (PC1). A questo punto la componente successiva è calcolata in modo da “spiegare” la maggior parte della varianza “residua”. La seconda componente principale deve essere ortogonale alla prima. Il procedimento continua

fino a che non si siano calcolate tutte le PC. La varianza lungo ciascuna delle nuove variabili (PC) si indica con  $\lambda_i$  ( $i=1,N$ ) ed è chiamata *autovalore* della componente principale. È quindi possibile quantificare la percentuale della variabilità totale spiegata da ciascuna componente principale e la percentuale di varianza spiegata complessivamente dalle prime  $j$  componenti principali. È importante sottolineare che nella PCA non si fa a priori nessuna assunzione sull'esistenza di gruppi; essa infatti punta a massimizzare la separazione fra gli oggetti (campioni) non fra i gruppi (etichette) (Viscosi, 2007).

#### 4.9.3 Variabilità genetica e equilibrio di Hardy-Weinberg

Dai dati ottenuti dall'analisi elettroforetica dei campioni sono poi state effettuate delle stime sulla variabilità genetica, sulle deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg e sulla variabilità genetica intra e inter-popolazioni. Per le elaborazioni sono stati utilizzati i programmi GenAlex6 (Peakall & Smouse, 2006), e F-Stat (Goudet J., 2001). Il principio d'equilibrio di Hardy-Weinberg è la legge base della genetica di popolazioni e afferma che in una popolazione infinitamente grande, in cui si verifica un incrocio casuale (popolazione panmittica), sulla quale non agiscono mutazione, migrazione e selezione naturale, le frequenze alleliche non variano di generazione in generazione, mentre le frequenze genotipiche sono determinate dal prodotto delle frequenze alleliche corrispondenti (Hartl e Clark, 1997).

L'eterozigosità osservata ( $H_O$ ) e eterozigosità attesa ( $H_E$ , pesata sulla dimensione della popolazione) sono state stimate dal *software* GenAlex6 (Peakall & Smouse, 2006). Il disequilibrio di HW può verificarsi a causa degli errori commessi durante la fase di *scoring* dei dati delle sequenze microsatellite (DeWoody et al., 2006) o per effetto dell'esistenza di fenomeni biologici e/o evolutivi. I fenomeni biologici e/o evolutivi in grado di provocare il disequilibrio di Hardy-Weinberg sono costituiti dall'*inbreeding*, deriva genetica, riproduzione non casuale e selezione naturale. Il *linkage disequilibrium* (associazione gametica preferenziale) è il fenomeno per cui specifiche combinazioni di alleli a due *loci* abbiano una frequenza diversa da quella (Hartl e Clark, 1997). La ricchezza allelica, misura il numero medio degli alleli per *locus* indipendentemente dalla grandezza della popolazione fornendo una misura del numero di alleli standardizzata rispetto al campione più piccolo, in modo da poter confrontare tra loro, in maniera coerente, tutti i campioni di popolazioni (Leberg, 2002). Per analizzare la distribuzione delle frequenze alleliche è stato utilizzato programma F-Stat (Goudet J., 2001). L'eccesso di omozigosità viene comunemente studiato applicando le

statistiche F, definite da Wright (1978) secondo cui, le popolazioni possiedono tre livelli di complessità, che possono essere stimati mediante tre indici:

- $F_{IS}$ , che misura la consanguineità (*inbreeding*) relativa degli individui (I) rispetto alla popolazione (S) a cui appartengono.
- $F_{ST}$ , che misura la fissazione di un allele, dovuta alla deriva genetica casuale, in termini di riduzione dell'eterozigosità della popolazione (S) rispetto alla popolazione complessiva (T). Questo indice viene utilizzato per stimare la suddivisione delle popolazioni (S).
- $F_{IT}$ , che misura la consanguineità relativa degli individui (I), rispetto alla popolazione totale (T) (Barodzych, 2009).

In questo modo, la variabilità genetica può essere suddivisa in una componente intra- ( $F_{IS}$ ) e una tra-popolazioni ( $F_{ST}$ ). Valori positivi di  $F_{IS}$  corrispondono a un deficit di eterozigoti, mentre un valori negativi ne indicano un eccesso. Il deficit può indicare una strutturazione delle popolazioni (S), mentre un eccesso di eterozigoti può essere un indice di accoppiamento non casuale (*inbreeding*) o maggiore *fitness* degli eterozigoti e l'indice  $F_{ST}$  rappresenta una stima sia del flusso genico che della fissazione (Barodzych, 2009).

## Capitolo5

### Risultati

L'elevato numero di loci microsatellite e di campioni sottoposti a caratterizzazione molecolare hanno restituito una considerevole mole di informazioni. La scelta del protocollo della PCR Multiplex, messa a punto per *Q. petraea* e *Quercus robur* (Guichoux *et al.*, 2011), si è rivelata un metodo altamente discriminante: un primo risultato ha, infatti, evidenziato che tutti i 12 SSR hanno mostrato un elevato grado di polimorfismo rivelando la loro specificità per le specie investigate. Tutte e tre le specie hanno mostrato il 100% dei loci polimorfici (Tab. 5.1):

Specie	%P
<i>Q.frainetto</i>	100%
<i>Q.petraea</i>	100%
<i>Q.pubescens</i>	100%

Tab. 5.1 Percentuale di loci polimorfici

Su un totale di 905 campioni genotipizzati, sono stati ottenuti risultati relativamente a 862 campioni, poichè da 43 campioni non è stata ottenuta alcuna amplificazione (Tab. 5.2).

Regione di provenienza	n.campioni raccolti e genotipizzati	n.campioni testati con successo	n.campioni non amplificati
Puglia	379	338	41
Lazio	210	209	1
Molise	303	303	0
Slovenia	13	12	1
tot	905	862	43

Tab. 5.2 Individui testati con successo.

Nessun microsatellite ha presentato problemi di amplificazione. La genotipizzazione dei prodotti della PCR è stata effettuata con l'utilizzo del sequencer ABI-3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) e i risultati sono stati successivamente analizzati con i software STRand 2.4.55 - Nucleic Acid Analysis Software (University of California) e Peak Scanner TM 1.0 (Applied Biosystems). Le 12 coppie di primers sono state precedentemente testate presso i laboratori dell'INRA di Pierrotton su 16 individui provenienti da diversi stand di campionamento. I test sono stati effettuati per raggiungere condizioni di amplificazione PCR-multiplex ottimali e per verificare la compatibilità in termini sia di dimensione dei frammenti che di performance di ogni locus. Dei 12 loci, tutti sono risultati essere polimorfici e quindi adatti ad un'analisi di popolazione.

L'analisi degli elettroferogrammi restituiti dai software ha portato alla creazione di una



matrice di dati grezzi che sono stati successivamente elaborati mediante la procedura del *binning* manuale al fine di raggruppare gli alleli di taglia uguale. Questa operazione ha rappresentato un passaggio fondamentale per poter ottenere la taglia reale degli alleli individuati per ogni marker, da utilizzare poi nelle successive analisi statistiche. I campioni provenienti dall'area campione molisana (BT) e dalla Slovenia sono stati utilizzati come confronto nelle analisi bayesiane e non inseriti nelle successive analisi statistiche. I risultati ottenuti dalle successive analisi statistiche sono stati organizzati in base ai due principali aspetti dello studio:

8. Risultati relativi allo studio della variabilità genetica a differente scala geografica, di popolazioni naturali, miste e pure, di *Q. pubescens* nell'Italia centro-meridionale;
9. Risultati relativi allo studio dell'analisi dei flussi genici rilevati nelle popolazioni parentali di *Q. frainetto*, *Q. petraea* e *Q. pubescens*.

### 5.1 Il dimensionamento degli alleli: la fase di 'binning'

I grafici riportati nella sez. appendice (fig. da n. 1 a n. 12), mostrano i risultati del dimensionamento allelico: le taglie individuate per singolo locus caratterizzano i grafici con dei veri e propri "salti dimensionali" di due o tre nucleotidi. I dati analizzati si basano infatti su loci microsatellitari di-nucleotidici o tri-nucleotidici che possono variare solo per 2 - 3 nucleotidi o multipli di essi. Nella tabella 5.3 sono riportate tutte le forme alleliche individuate nell'intero campione:

alleles	PIE020	PIE223	PIE152	PIE242	PIE102	PIE243	PIE267	PIE258	PIE215	PIE239	PIE227	PIE271
97	197	228	102	139	202	80	128	185	69	156	182	
99	200	230	104	141	204	84	130	188	71	159	184	
101	203	232	106	143	206	86	132	191	73	162	186	
103	206	234	108	145	208	88	134	194	75	165	188	
105	209	236	110	147	210	90	136	197	77	172	190	
107	212	238	112	149	212	92	138	200	79	175	192	
109	216	240	114	151	214	94	140	203	81	178	194	
113	219	242	116	153	216	96	143	206	83		196	
115	222	244	118	155	218	98	145	209	85		198	
119	225	246	120	157	220	100	147	212	87		200	
		228	248	122	159	222	102	149	215	89	202	
		234	250	124	161	224	104	151	218	91	204	
			252	128	163		106	153	221	93	208	
			254	130	165			155		94		
			256	132	167			157		96		
			258		169			159				
			259									
			260									
			262									
tot 161	10	12	19	15	16	12	13	16	13	15	7	13

Tab. 5.3 Forme alleliche (in bp) individuate nell'intero campione.

Complessivamente, le analisi condotte hanno rivelato la presenza di 161 alleli nelle tre specie indagate (Tab. 5.3). La taglia degli alleli è compresa tra 69 e 262 bp con una media di 13,42 bp per locus. In dettaglio, il locus Pie152 ha mostrato un maggior grado di polimorfismo, con

19 alleli, seguito dai loci Pie102 e Pie258 con 16 alleli mentre il locus Pie 227 ha rivelato un minor polimorfismo con 7 forme alleliche (tab. 5.3). Analizzando i risultati dell'area studio di Monte Vairano si evidenzia che il numero di alleli totali rilevati è 138 (tab. 2 appendice), mentre nei campioni laziali e pugliesi sono stati rilevati, rispettivamente, 131 e 134 alleli, mostrando sensibili differenze nei singoli locus (tab. 3 e 4 appendice).

## **5.2 Analisi di classificazione bayesiana**

L'analisi della struttura delle popolazioni è stata effettuata mediante analisi di classificazione bayesiana con il software *Structure* 2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000).

Quest' analisi ha permesso di classificare gli individui in cluster a partire dai loro genotipi multilocus. Il numero dei cluster e l'assegnazione degli individui a ciascuno di essi sono definite senza assegnamento *a priori*. Ciò è stato effettuato per individuare il numero di cluster significativi (genotipi) presenti nel campione totale e per ottenere una stima probabilistica per ogni individuo di appartenere a una specie pura o di essere un ibrido. Le simulazioni in *Structure* sono state effettuate per un numero di cluster (K) compreso tra 1 e 6 (per tutti i campioni) e con K compreso tra 1 e 9 (per i campioni dell'area simpatica di Monte Vairano) con 10 permutazioni per ogni K effettuate con il metodo del modello misto (100,000 burn-in periods, 1,000,000 MCMC repeats after burning). E' stato utilizzato il modello di "discendenza per mescolamento" (admixture model), che prevede che gli individui possano avere antenati recenti in più di un gruppo. Inoltre, è stato utilizzato il modello delle frequenze alleliche correlate (Correlated Allele Frequencies model, Falush *et al.*, 2003), che assume che le frequenze alleliche nei vari gruppi possano essere simili, a causa della migrazione o della discendenza comune ( $F_{st}$  per popolazione=0.01, deviazione standard=0.05, valore di lambda costante=1.0). Mediante questo tipo di analisi di classificazione bayesiana si assume che, in un modello con un determinato numero di popolazioni (K), i genotipi vengono assegnati ad i diversi cluster in modo tale che non ci sia linkage-disequilibrium fra coppie di loci e tutte le popolazioni siano in equilibrio di Hardy-Weinberg. I risultati ottenuti per ogni permutazione sono stati analizzati per individuare il numero di cluster più significativo. Il valore più probabile di K è stato calcolato con il metodo di Evanno *et al.* (Evanno *et al.*, 2005) mediante il calcolo del  $\Delta K$  per ogni numero di cluster considerato (CorrSieve, ambiente R). Tale procedura ha portato all'individuazione di tre genotipi (K=3), significativamente differenziati, sia per le simulazioni con un numero di K compreso tra 1 e 6 che per le simulazioni con un numero di K compreso tra 1 e 9. I tre cluster individuati corrispondono alle tre specie individuate *a priori* (*Q. frainetto*, *Q. petraea* e *Q. pubescens*) su base morfologica (Fig. 5.1 a

e b).

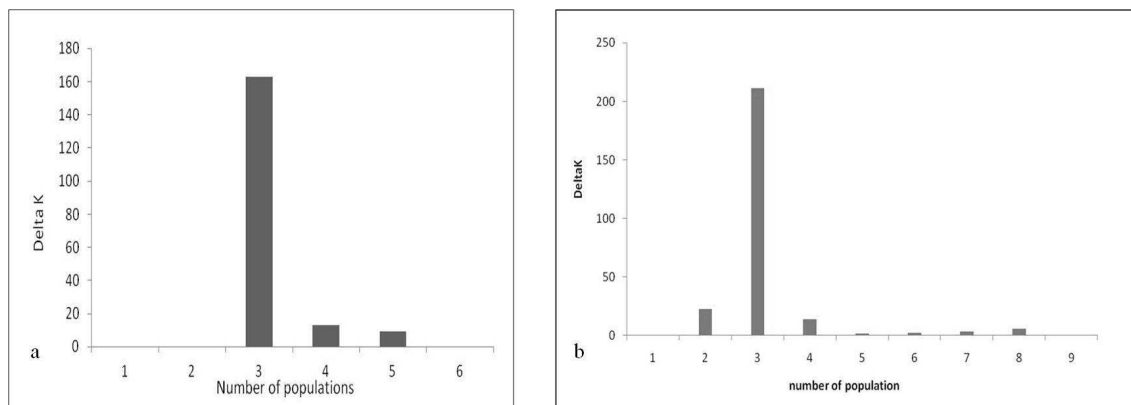


Fig. 5.1: Stima del numero di popolazioni (a) K da 1 a 6 e (b) K da 1 a 9 calcolata con il metodo del  $\Delta K$  (Evanno *et al.*, 2005).

I risultati ottenuti con *Structure* mostrano che ogni individuo presenta una diversa percentuale di appartenenza ad ognuno dei cluster individuati. Un individuo è stato considerato puro quando la sua probabilità di appartenere ad uno specifico cluster è superiore a 80% ( $Q \geq 0.800$ ). Gli individui, che per tutte e tre le specie, hanno  $Q$  compreso tra 0.200 e 0.800 sono stati considerati ibridi o introgressi. Sulla base dei risultati ottenuti sono state identificate le seguenti tipologie di genotipi ibridi, quali: *Q.frainetto*X*Q.petraea*, *Q.frainetto*X*Q.pubescens*, *Q.petraea*X*Q.pubescens*, *Q.frainetto*X*Q.petraea*X*Q.pubescens*. La figura 5.2 mostra i risultati di tale analisi sottoforma di un grafico che si presenta come un fittissimo istogramma in cui, a ciascuno degli 862 individui corrisponde una sottile barra verticale, ripartita in K colori. Ogni colore rappresenta la probabilità che ogni singolo individuo ha di appartenere ad uno dei tre cluster. Nella figura 5.2-A, gli individui sono disposti lungo l'asse delle ascisse in base all'ordine crescente/decrescente di  $Q$ .

Nella figura 5.2-A i numeri da 1 a 24 rappresentano gli stand dei campioni raccolti nella regione Puglia, da 25 a 31 quelli raccolti in Lazio, il 32 i campioni raccolti in Slovenia e dal 32 a 42 quelli raccolti nella regione Molise. In dettaglio, si evidenzia come gli stand da 1 a 31 (tutte le stazioni pugliesi e laziali) e lo stand 41 (stand MV08 del Molise) sono caratterizzati dalla presenza quasi esclusiva di individui appartenenti a *Q. pubescens*, mentre gli stand 35 e 40 (MV7 ed MV4) sono caratterizzati da popolamenti a *Q. frainetto* ed infine negli stand 33, 36, 39 e 42 (BT, MV03, MV06 e MV09) è presente *Q. petraea*. I restanti stand mostrano un pattern di appartenenza ai tre cluster più eterogeneo. Nella figura 5.3 sono mostrati i risultati del clustering genetico degli stand dell'Italia centro-meridionale in base alla loro provenienza geografica.

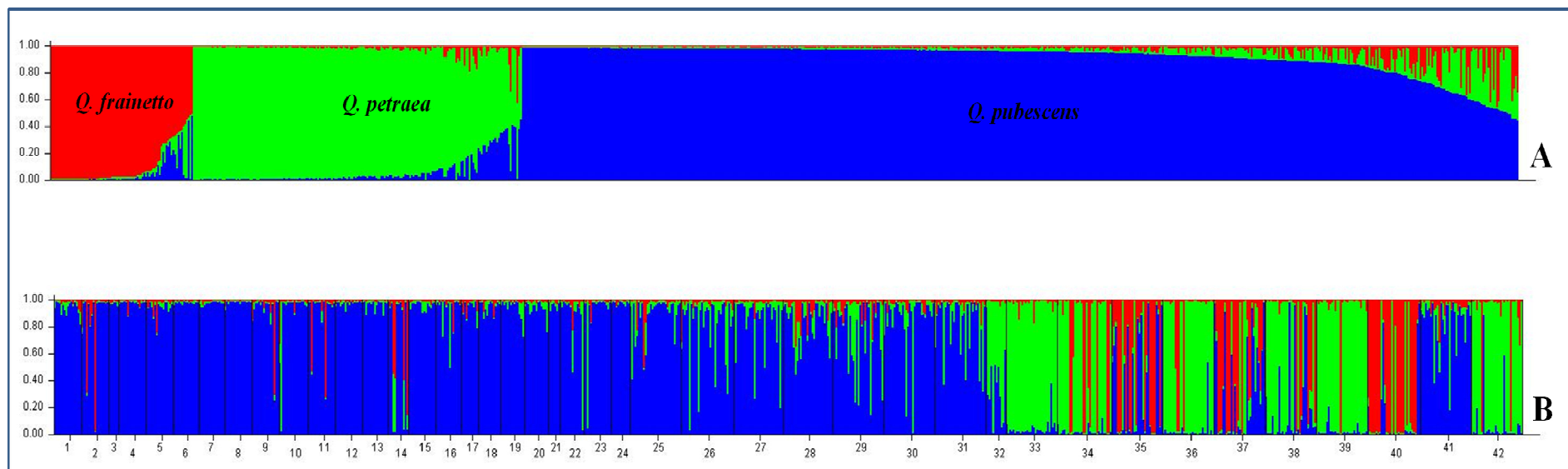


Fig. 5.2. Assegnamento genetico degli 862 individui ottenuto con il software di analisi bayesiana *Structure* (senza informazioni *a priori*). Gli istogrammi mostrano la probabilità d'appartenenza (Q) di ogni individuo ai tre cluster rilevati mediante *Structure*. Gli individui sono ordinati per probabilità di appartenenza alle tre specie con Q decrescente (A) e per singolo stand (B - ogni stand è delimitato da una linea verticale nera). I numeri degli stand di campionamento fanno riferimento alla tabella n. 4.1 –capitolo 4.

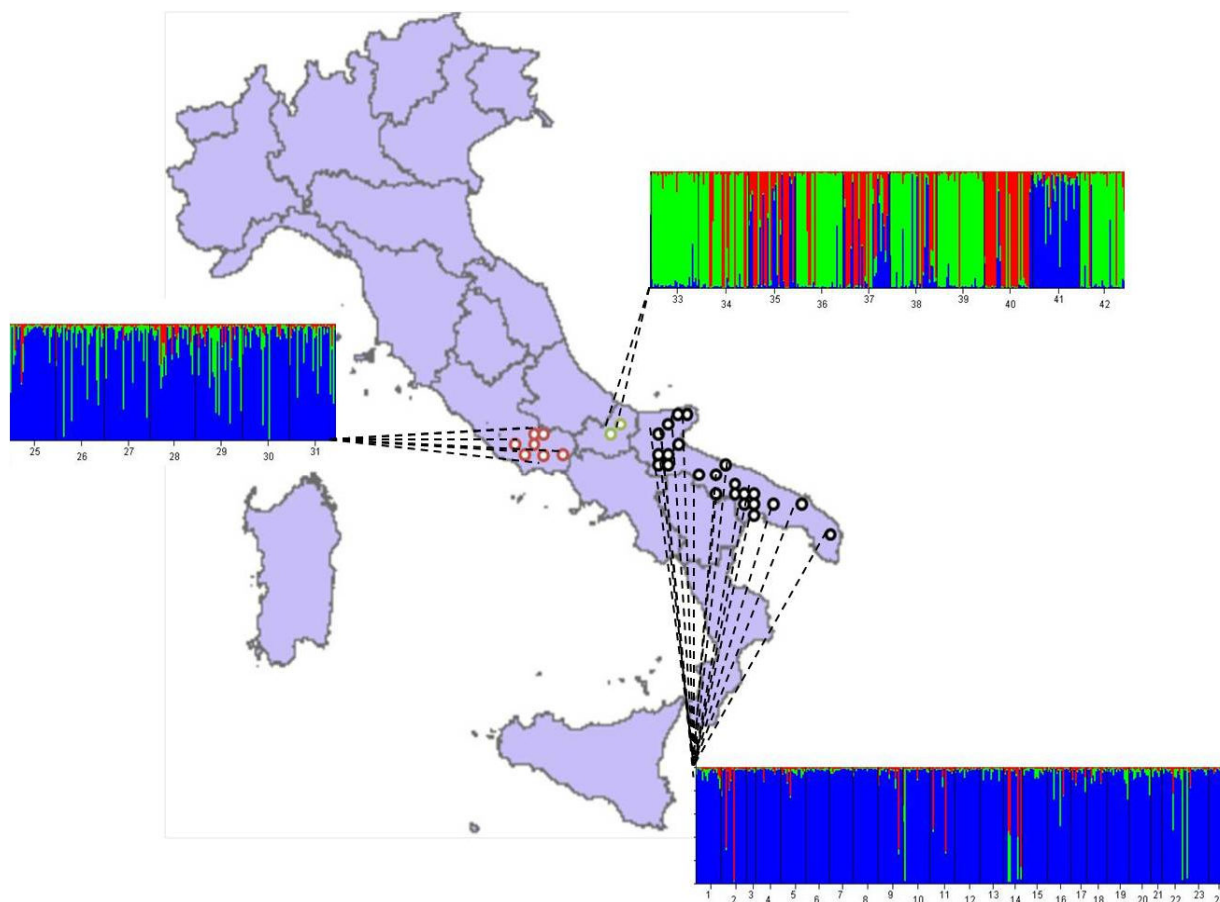


Fig.5.3 Risultati del clustering genetico effettuato con *Structure*. Le barre verticali rappresentano la composizione genetica degli individui raggruppati in cluster (blu - *Q. pubescens*; rosso - *Q. frainetto*; verde - *Q. petraea*). I numeri degli stand di campionamento fanno riferimento alla tabella n. 4.1 – capitolo 4.

### 5.3 Molise

I risultati dell'analisi bayesiana effettuata sugli stand campionati nel sito SIC di Monte Vairano, indicano che le tre specie pure coesistono nell'area in presenza di un apprezzabile numero di individui ibridi (Tab.5.6). L'area è, infatti, caratterizzata dal 77.24% di specie pure e dal 22.76% di genotipi ibridi. Le stazioni MV1, MV2, MV3, MV6 e MV8 mostrano da un'elevata presenza di individui puri con valori che vanno dal 73.33% al 96.67% (fig 5.4). Una maggiore presenza di individui ibridi è stata invece riscontrata nelle stazioni MV4, MV5 ed MV9, rispettivamente, con il 30%, il 42.86% ed il 28.57% di questi. Complessivamente nell'area di Monte Vairano risulta che: *Q. petraea* è caratterizzata dalla percentuale maggiore (35.82%) di individui puri (96), seguita da *Quercus frainetto* (20.90% con 56 individui) e da *Q. pubescens* (20.52 % con 55 individui). Inoltre, l'abbondanza in percentuale delle diverse classi di ibridi mostra che gli ibridi *Q.petraeaXQ.pubescens* (29) sono i più numerosi con

valori del 10.82% mentre gli altri sono più rari: *Q.frainettoXQ.pubescens* (5.97%), *Q.pubescensXQ.petraeaXQ.frainetto* (3.36%) e *Q.frainettoXQ.petraea* (2.61%). Per quanto riguarda la composizione degli stand, individui puri di *Q. frainetto* e *Q. petraea* sono stati rinvenuti in tutti gli stand ad eccezione di MV08, caratterizzato esclusivamente da *Q. pubescens*. Gli individui ibridi sono stati rinvenuti in tutti gli stand e *Q.petraeaXQ.pubescens* sono i più diffusi. Inoltre gli individui ibridi di *Q. petraea* and *Q. pubescens* sono anche in quegli stand dove sono assenti gli individui puri di queste specie. Gli ibridi di *Q. frainetto* e *Q. petraea* sono presenti negli stand MV01, MV03, MV07 e MV09: in ognuno di questi sono presenti anche gli individui puri di queste specie. Ciò avviene anche per gli ibridi di *Q. frainetto* e *Q. pubescens* negli stand MV02, MV04, MV05 e MV07 (tab. 5.4). Infine, individui ibridi caratterizzati da un contributo significativo di tutte e tre le specie parentali, sono stati ritrovati negli stand MV01, MV04, MV05, MV06 e MV09: questi stand sono tutti caratterizzati dalla presenza di *Q. frainetto* and *Q. petraea* mentre *Q. pubescens* è stato ritrovato solo negli stand MV04 and MV05 (tab. 5.4).

Stand	N	<i>fra</i>	<i>pet</i>	<i>pub</i>	<i>fraXpet</i>	<i>fraXpub</i>	<i>petXpub</i>	<i>pubXpetXfra</i>	Species	Hybrids
		8	18		1		3	2	26	6
1	32	(25.00)	(56.25)	-	(3.13)	-	(9.38)	(6.25)	(81.25)	(18.75)
		11	1	10	1	4	2	1	22	8
2	30	(36.67)	(3.33)	(33.33)	(3.33)	(13.33)	(6.67)	(3.33)	(73.33)	(26.67)
		3	20		1		6		23	7
3	30	(10.00)	(66.67)	-	(3.33)	-	(20.00)	-	(76.67)	(23.33)
		9	2	10		7	1	1	21	9
4	30	(30.00)	(6.67)	(33.33)	-	(23.33)	(3.33)	(3.33)	(70.00)	(30.00)
		2	11	3		3	7	2	16	12
5	28	(7.14)	(39.29)	(10.71)	-	(10.71)	(25.00)	(7.14)	(57.14)	(42.86)
		1	23		1		4	1	24	6
6	30	(3.33)	(76.67)	-	(3.33)	-	(13.33)	(3.33)	(80.00)	(20.00)
		20	3	3	2	2			26	4
7	30	(66.67)	(10.00)	(10.00)	(6.67)	(6.67)	-	-	(86.67)	(13.33)
				29			1		29	1
8	30	-	-	(96.67)	-	-	(3.33)	-	(96.67)	(3.33)
		2	18		1		5	2	20	8
9	28	(7.14)	(64.29)	-	(3.57)	-	(17.86)	(7.14)	(71.43)	(28.57)
		56	96	55	7	16	29	9	7	61
<b>Total</b>	268	(20.90)	(35.82)	(20.52)	(2.61)	(5.97)	(10.82)	(3.36)	(77.24)	(22.76)

Tab. 5.4 Risultati dell'assegnamento genetico degli individui degli stand molisani. Per ogni genotipo (puro o ibrido) è riportato il numero di individui e la loro percentuale (tra parentesi).

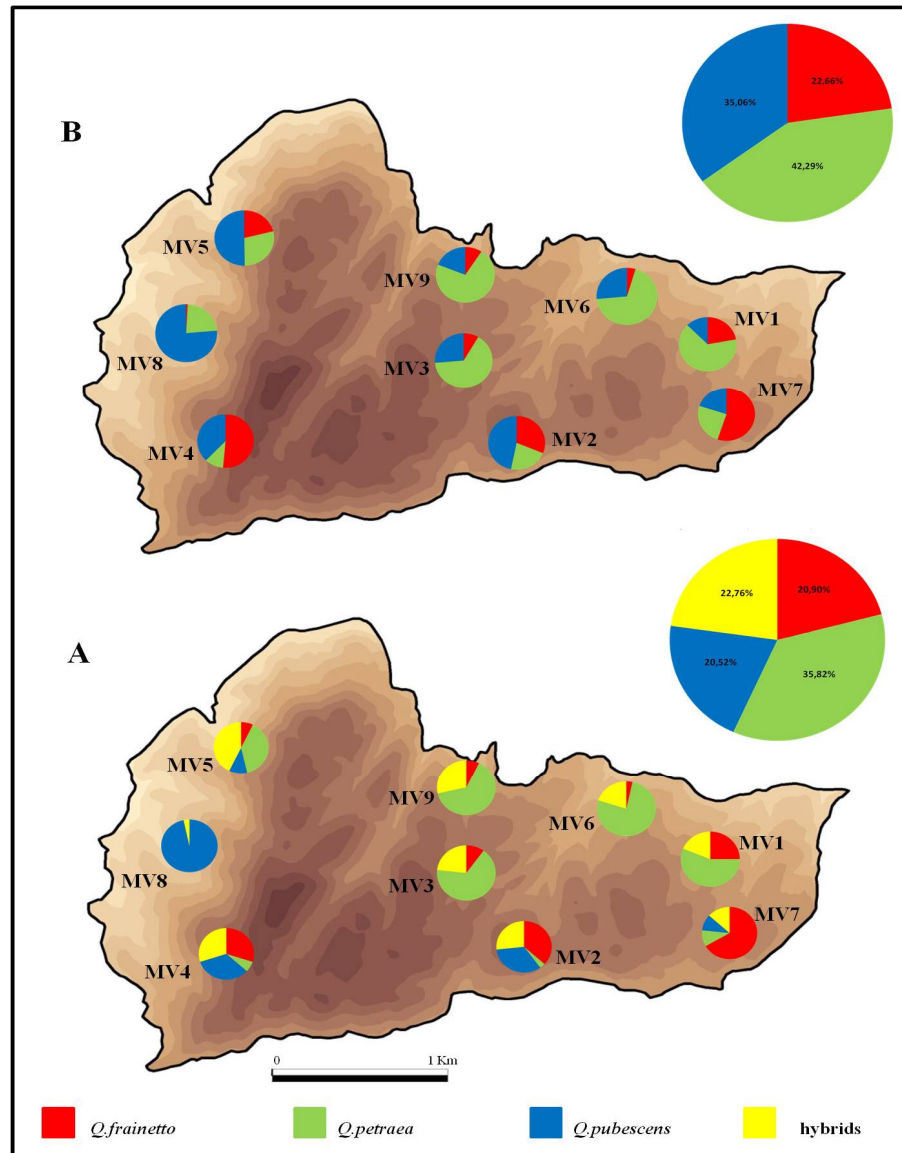


Fig. 5.4: Distribuzione dei genotipi negli stand nell'area studio di Monte Vairano (A) e della ripartizione dei genotipi negli individui ibridi (B).

#### 5.4 Lazio

Su un campione complessivo di 209 individui proveniente dal settore meridionale del Lazio, il 77.51% è costituito da specie pure, principalmente appartenente a *Q. pubescens* (76.64%) mentre una piccolissima percentuale appartiene *Q. petraea* (2.87% - Tab. 5.5, fig 5.5). Il 22.49% degli individui è costituita da individui ibridi, principalmente di tipo *Q. pubescens* X *Q. petraea*. In dettaglio, i risultati di *structure* mostrano che la popolazione CAS è caratterizzata dall'80% (24) di individui puri appartenenti a *Q. pubescens* e dal 20% (6) di ibridi. Di questi 4 appartengono al genotipo *Q. pubescens* X *Q. petraea* e 2 a *Q. pubescens* X *Q. frainetto*.

La popolazione SAN è caratterizzata da 76.67% (23) di individui puri tra gli adulti

appartenenti a *Q. pubescens*, dal 6.67% (2) di individui puri appartenenti a *Q. petraea* e dal 16.67% (5) individui ibridi; di questi ultimi 4 appartengono al genotipo *Q.pubescensXQ.petraea* e 2 a *Q.pubescensXQ.frainetto*.

Stand	Nome sito	N	<i>pet</i>	<i>pub</i>	<i>fraXpub</i>	<i>petXpub</i>	<i>pubXpetXfra</i>	Species	Hybrids
				24	2	4		24	6
1	cas	30	-	(80.00)	(6.67)	(13.33)	-	(80.00)	(20.00)
			2	23	1	4		25	5
2	san	30	(6.67)	(76.66)	(3.33)	(13.33)	-	(83.33)	(16.67)
				25		5		25	5
3	tor	30	-	(83.33)	-	(16.67)	-	(83.33)	(16.67)
				19	4	4	2	19	10
4	mar	30	-	(62.52)	(13.33)	(13.33)	(6.67)	(62.52)	(34.48)
			1	19	2	8		20	10
5	acu	29			(6.90)	(27.59)	-	(66.67)	(33.33)
			3	25		3		28	2
6	cor	30	(3.45)	(86.21)	-	(10.00)	-	(93.33)	(6.67)
				21	1	8		21	9
7	pda	30	-	(70.00)	(3.33)	(26.67)	-	(70.00)	(30.00)
			6	156	10	36	2	162	47
<b>Total</b>	<b>Total</b>	209	(2.87)	(76.64)	(4.78)	(17.22)	(0.96)	(77.51)	(22.49)

Tab. 5.5 Risultati dell'assegnamento genetico degli individui degli stand laziali. Per ogni genotipo (puro o ibrido) è riportato il numero di individui e la loro percentuale (tra parentesi).

La popolazione TOR è caratterizzata dall'83.33% (25) di individui di *Q. pubescens*, dal 16.67% (5) di ibridi, tutti appartenenti al *Q.pubescensXQ.petraea*. La popolazione MAR è caratterizzata da 65.52% (19) di individui appartenenti a *Q. pubescens*, dal 34.48% (10) di individui ibridi; di questi ultimi 4 appartengono al genotipo *Q.pubescensXQ.petraea*, 2 a *Q.pubescensXQ.frainetto* e 2 a *Q.pubescensXQ.petraeaXQ.frainetto*.

La popolazione Lestra delle Vacche – Acuto (FR) è caratterizzata dal 63.33% di individui di *Q. pubescens* e 3.33% (1) di individui puri appartenenti a *Q. petraea*. Questa popolazione è composta inoltre dal 33.33 % (10 individui) ibridi, di cui 8 individui *Q.pubescensXQ.petraea* e 2 *Q.pubescensXQ.frainetto*.

La popolazione di Monte Feuci COR è caratterizzata dall'83.33% di individui di *Q. pubescens* e dal 10% (3) di *Q. petraea*. Questa popolazione è caratterizzata da una bassa percentuale (6.67%) di individui ibridi (2) con genotipo *Q.pubescensXQ.petraea*.

La popolazione di Monte Feuci PDA è caratterizzata dal 70% (21) 86.67 % di individui di *Q. pubescens* e dal 30% (9) individui ibridi. Di questi ultimi 8 appartengono all'ibrido *Q.pubescensXQ.petraea* e 1 a *Q.pubescensXQ.frainetto*.



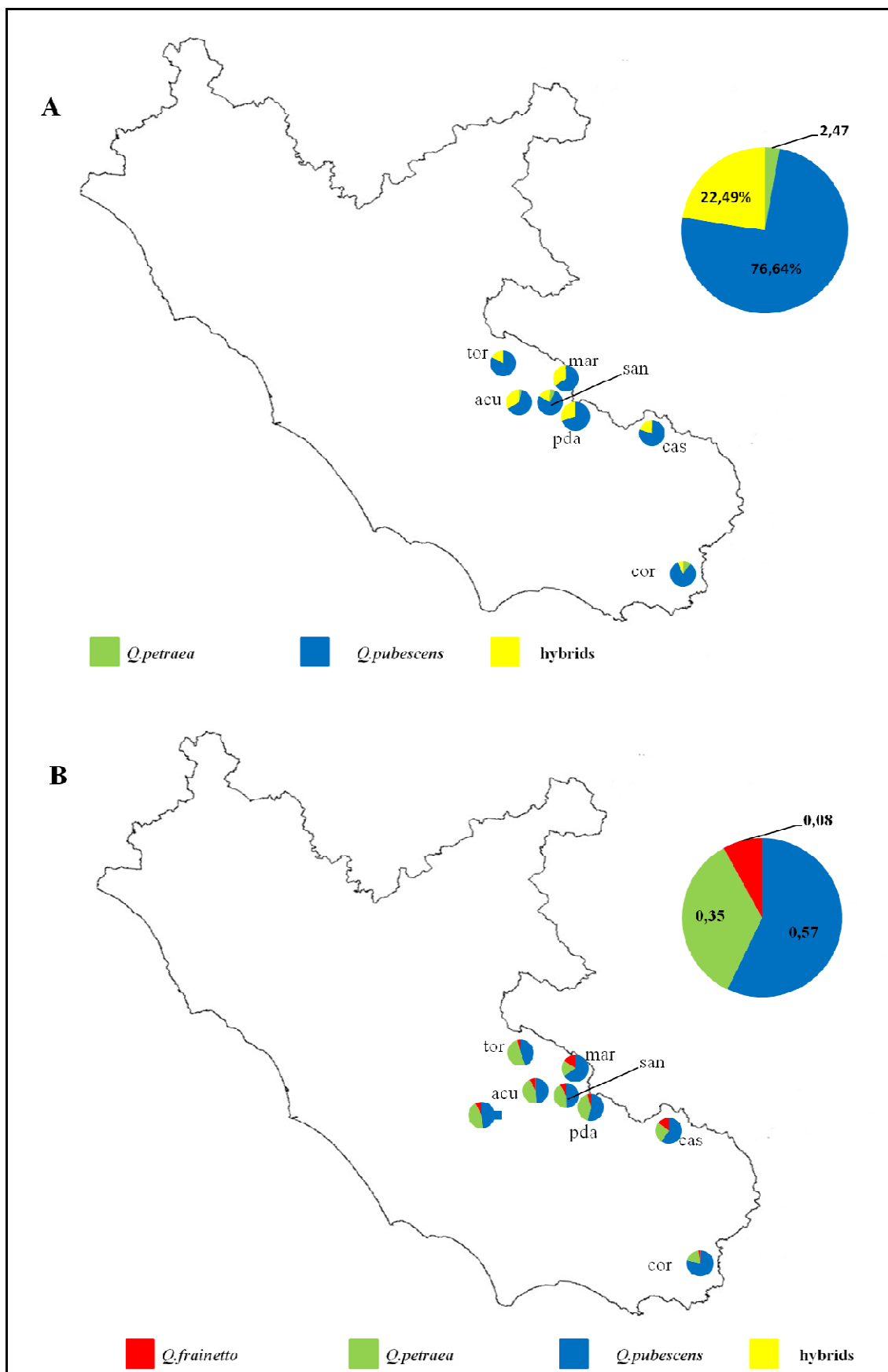


Fig. 5.5. Distribuzione dei genotipi negli stand laziali (A) e della ripartizione dei genotipi negli individui ibridi (B).

## 5.5 Puglia

Stand	Nome sito	n	<i>fra</i>	<i>pet</i>	<i>pub</i>	<i>fraXpet</i>	<i>fraXpub</i>	<i>petXpub</i>	Species	Hybrids
1	acquaviva	16	-	-	16 (100.00)	-	-	-	16 (100.00)	-
2	accadia	16	1 (6.25)	-	13 (81.25)	-	2 (12.5)	-	14 (87.50)	2 (12.5)
3	bosco del compare	6	-	-	6 (100.00)	-	-	-	6 (100.00)	-
4	bosco di acquatetta	16	-	-	16 (100.00)	-	-	-	16 (100.00)	-
5	cagnano	16	-	-	15 (93.75)	-	1 (6.25)	-	15 (93.75)	1 (6.25)
6	chiancate	15	-	-	15 (100.00)	-	-	-	15 (100.00)	-
7	consolazione	15	-	-	15 (100.00)	-	-	-	15 (100.00)	-
8	deliceto	16	-	-	16 (100.00)	-	-	-	16 (100.00)	-
9	difesa coste	16	-	-	15 (93.75)	-	1 (6.25)	-	15 (93.75)	1 (6.25)
10	difesa grande	17	-	1 (5.88)	15 (88.24)	-	1 (5.88)	-	16 (94.12)	1 (5.88)
11	farnetto	16	-	-	14 (87.50)	-	2 (12.50)	-	14 (87.50)	2 (12.50)
12	incoronata	16	-	-	16 (100.00)	-	-	-	16 (100.00)	-
13	jazzo pagliara	15	-	-	15 (100.00)	-	-	-	15 (100.00)	-
14	lago laterza	12	1 (7.14)	-	8 (57.14)	3 (21.43)	-	-	9 (64.29)	3 (21.43)
15	lama del lato	16	-	-	16 (100.00)	-	-	-	16 (100.00)	-
16	palmariggi	15	-	-	15 (100.00)	-	-	-	15 (100.00)	-
17	parata	10	-	-	10 (100.00)	-	-	-	10 (100.00)	-
18	pianelle	13	-	-	13 (100.00)	-	-	-	13 (100.00)	-
19	quasano	14	-	-	13 (92.86)	-	-	1 (7.14)	13 (92.86)	1 (7.14)
20	sant'eramo r	14	-	-	13 (92.86)	-	-	1 (7.14)	13 (92.86)	1 (7.14)
21	sant'eramo s	7	-	-	7	-	-	-	7 (100.00)	-
22	selva san vito	14	-	1 (7.14)	12 (85.71)	-	-	1 (7.14)	13 92.86	1 7.14
23	umbra	16	-	1 (6.25)	15 (93.75)	-	-	-	16 (100.00)	-
24	vico	11	-	-	11	-	-	-	11 (100.00)	-
<b>Total</b>		338	2 (0.59)	3 (0.88)	320 (94.40)	3 (0.88)	7 (2.06)	3 (0.88)	325 (95.87)	13 (3.83)

Tab. 5.6 Risultati dell'assegnamento genetico degli individui degli pugliesi. Per ogni genotipo (puro o ibrido) è riportato il numero di individui (n) e la loro percentuale (tra parentesi).

I risultati dei campioni della regione Puglia sono molto omogenei: su un campione totale di 338 individui, il 95,87% risulta costituito da specie pure di *Q. pubescens* mentre un esiguo numero (13) ha rivelato un genotipo ibrido (tab. 5.6).

In dettaglio, 15 stand risultano composti dal 100% di specie pure di *Q. pubescens*: gli stand n. 1, 3, 4, 6, 7, 8, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 23, 24 (fig. 5.6.) mentre gli altri stand hanno rivelato una percentuale di genotipi puri di *Q. pubescens* che va dal 64.29 % al 93.75%.

Sono stati individuati 5 individui puri, non appartenenti al gruppo di *Q. pubescens* quali *Q. frainetto* (2) e *Q. petraea* (3) nei seguenti stand: stand n. 2 località Deliceto, stand n. 10 località Gravina di Puglia, stand n. 14 località Tafuri, stand n. 22 località Laterza e stand n. 23 località Gargano (tab. 5.7). Il 3.83% degli individui campioni ha mostrato un genotipo ibrido (stand n. 2, 5, 9, 10, 11, 14, 19, 20, 22) e, per quanto riguarda il contributo dei 3 genotipi negli ibridi, la maggior parte proviene da *Q. pubescens* (49%) e da *Q. frainetto* (35%) mentre *Q. petraea* partecipa in misura minore (16%).

La maggioranza degli ibridi rinvenuti appartengono principalmente al gruppo *Q. frainetto*X*Q. pubescens* e sono stati localizzati nell'area del Subappennino Dauno e delle Murge. Nell'area delle Murge è stato inoltre rilevato qualche raro esemplare di ibrido di *Q. petraea*X*Q. pubescens* (stand n. 19 e n. 20), di *Q. frainetto*X*Q. petraea* (stand n. 14) e di *Q. frainetto*X*Q. petraea*X*Q. pubescens* (stand n. 22) (fig. 5.6).

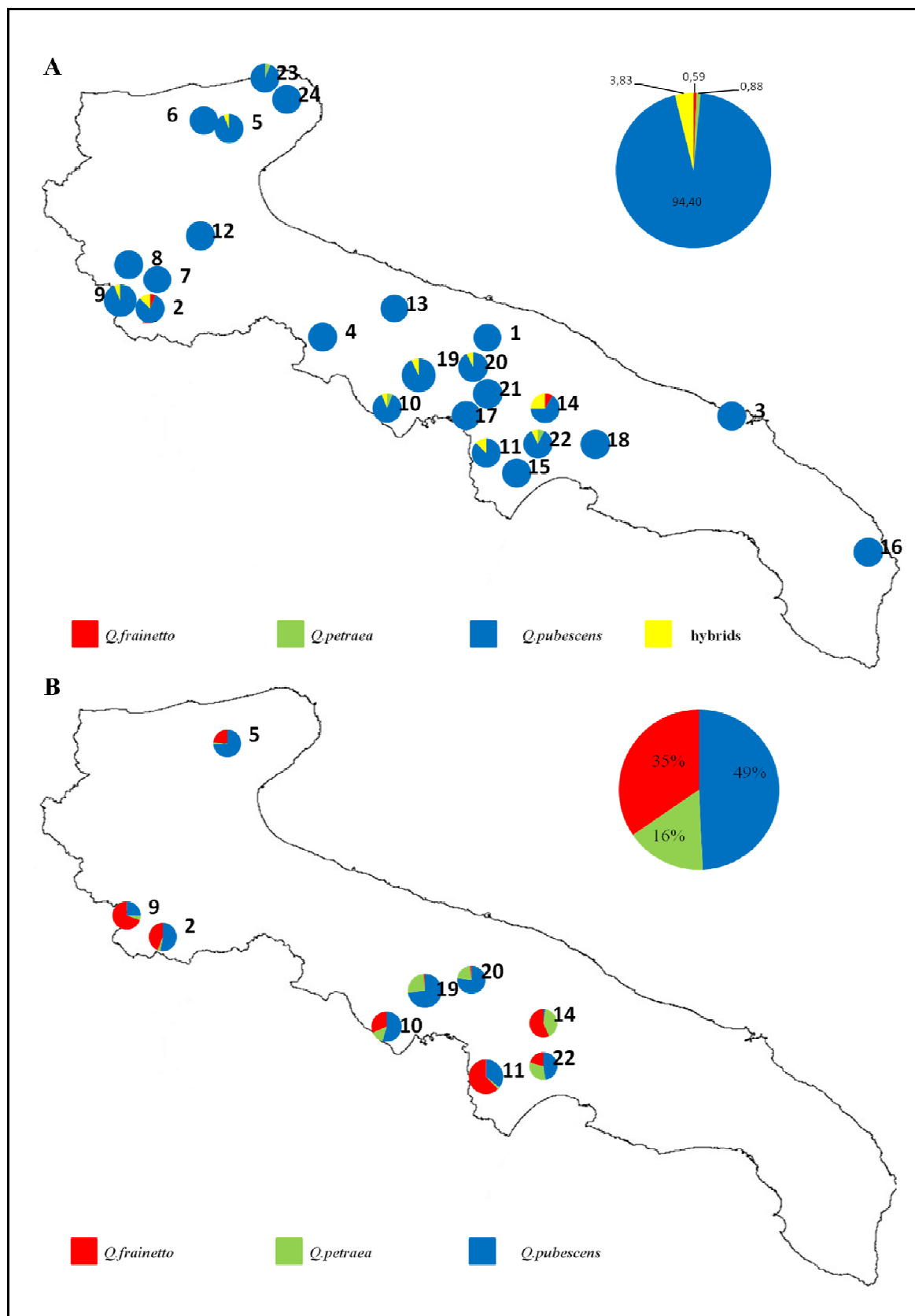


Fig. 5.6. Distribuzione dei genotipi negli stand pugliesi (A) e della ripartizione dei genotipi negli individui ibridi (B).

## 5.6 Principal Component Analysis

Dall'analisi con *structure* degli 862 campioni, è risultata più significativa l'analisi effettuata con  $K=3$ , che corrisponde alle tre specie morfologiche rilevate in campo: *Quercus frainetto*, *Q. petraea* e *Q. pubescens*; inoltre sono stati individuati i seguenti genotipi ibridi: *Q.frainettoQ.pubescens*, *Q.frainettoXQ.petraea*, *Q.petraeaXQ.pubescens* e *Q.frainettoXQ.pubescensXQ.petraea*.

In base a questi risultati, è stata creata una matrice con 746 individui puri che è stata successivamente sottoposta ad analisi delle componenti principali (PCA). Quest'ultima è stata effettuata mediante la matrice di distanza di Nei (Nei *et al.*, 1983). La PCA ha fornito un'ulteriore rappresentazione grafica delle 3 popolazioni nello spazio: l'ordinamento dei dati sulla base delle prime due componenti principali (fig. 5.7) mostra una chiara separazione tra le tre popolazioni in particolare, lungo la prima componente principale, si osserva una separazione di *Q. pubescens* dalle altre due specie, mentre la seconda componente principale spiega principalmente le differenze tra *Q. frainetto* e le altre due specie. In dettaglio, le prime due componenti principali spiegano rispettivamente il 31.32% e il 17.70% della variabilità genetica complessiva.

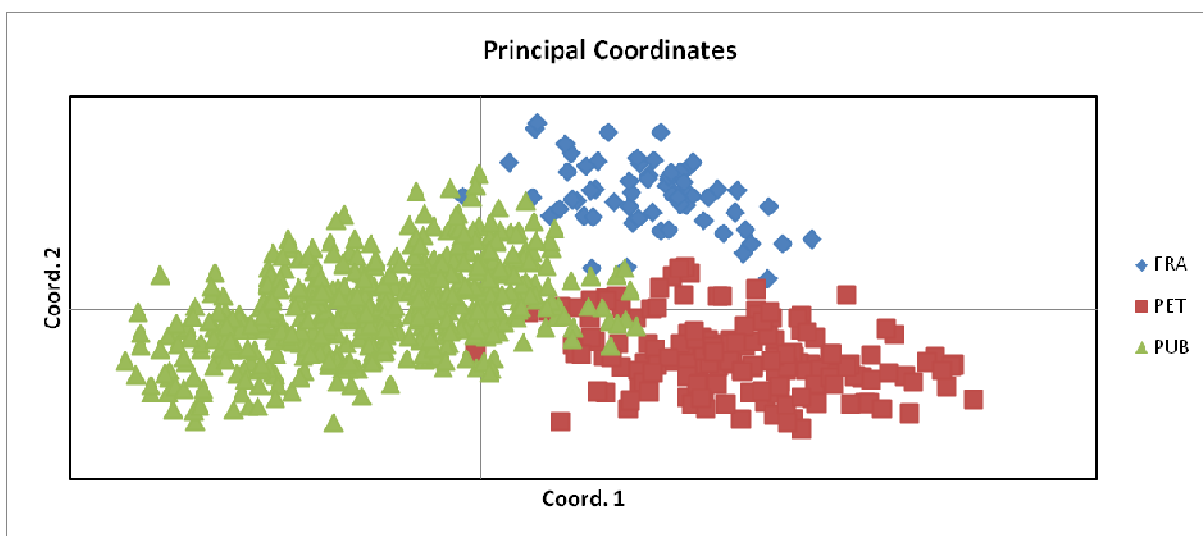


Fig. 5.7 Scatter plot delle due componenti principali effettuata su 746 individui puri delle tre popolazioni studiate.

Al fine di analizzare le relazioni genetiche intra-specifiche all'interno del gruppo di *Q. pubescens*, è stata effettuata una PCA sui soli campioni puri appartenenti a questa specie: l'analisi è stata effettuata su una matrice contenente 516 individui puri di *Q. pubescens* (provenienza: Lazio, Molise, Puglia). Attraverso una matrice di distanza di Nei, ne è risultato che, le prime due componenti principali spiegano rispettivamente il 23.30% e il 18.33% della variabilità genetica complessiva all'interno di tutti gli individui di *Q. pubescens*. Nello scatter

plot (fig. 5.8) ottenuto, in blu sono rappresentati gli stand in cui sono stati contrassegnati gli individui puri di *Q. pubescens* nella regione Puglia, in rosso quelli campionati nella regione Lazio, mentre in verde sono rappresentati quelli appartenenti allo stand molisano. Nella rappresentazione grafica della PCA effettuata sulla matrice di distanza di Nei (1987), si osserva che gli individui formano una nuvola dove si può supporre l'esistenza di un gradiente geografico che tende a separare gli individui laziali da quelli pugliesi, mentre gli individui molisani si collocano più vicini a quelli laziali, inoltre è evidente una discreta sovrapposizione di molti individui delle tre regioni all'interno dell'unica specie parentale (fig.5.8).

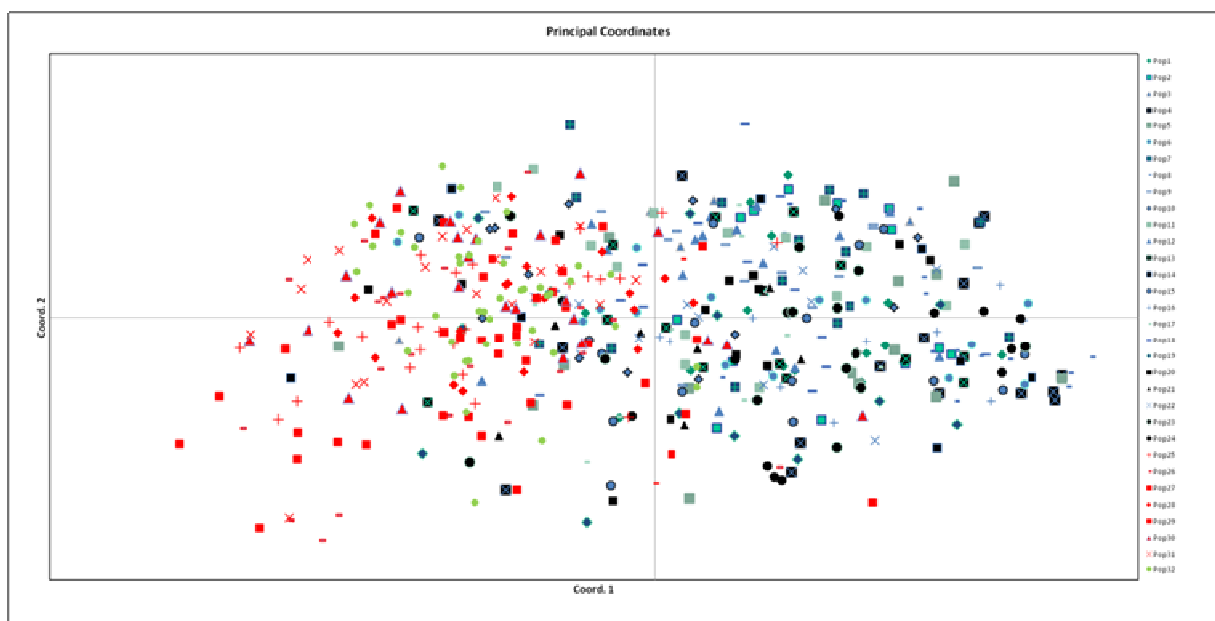


Fig. 5.8 Scatter plot delle due componenti principali effettuata su 516 individui di *Q. pubescens* provenienti da Lazio, Molise e Puglia.

## 5.7 AMOVA

È stata poi analizzata la ripartizione gerarchica della varianza nelle e tra le specie (tabella 5.8), mediante l'Analisi della Varianza Molecolare (AMOVA).

L'analisi della varianza molecolare ha permesso di studiare la partizione gerarchica della variazione genetica, oltre che il grado di differenziazione molecolare mediante test statistici. In particolare, risulta che la variabilità genetica è principalmente distribuita nelle 3 specie (86%), mentre una minor percentuale (14%) è relativa alle differenze tra le specie (fig. 5.9), differenze che risultano tuttavia significative ( $F_{st}=0.137$ ;  $p<0.001$ ; dove  $F_{st}$  è il rapporto tra la varianza stimata tra le specie e la varianza totale, mentre la significatività (P) è stimata mediante 999 permutazioni random).

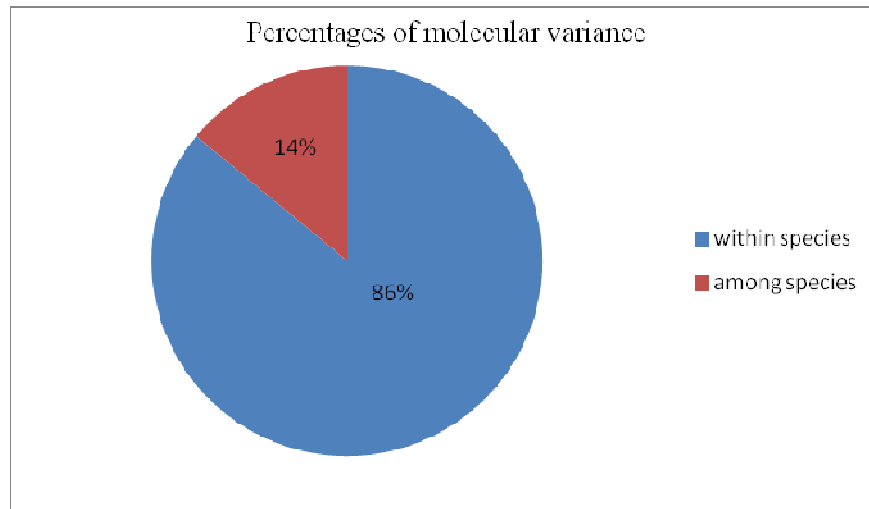


Fig. 5.9 Ripartizione della variabilità genetica intra- e inter-specie nell'interno campione.

E' stata inoltre effettuata l'AMOVA tra le specie (pairwise), per verificare la discriminazione osservata complessivamente tra le 3 specie e quindi per verificare tra quali di queste il grado di differenziazione molecolare è maggiore. L'AMOVA pairwise ha evidenziato differenze significative tra tutte le specie ( $p < 0.001$  sempre); in particolare, le maggiori differenze si sono evidenziate tra *Q. frainetto* e *Q. petraea* ( $F_{st}=0.165$ ), poi tra *Q. petraea* e *Q. pubescens* ( $F_{st}=0.122$ ) ed infine, tra *Q. frainetto* e *Q. pubescens* ( $F_{st}=0.115$ ), (tabella 5.7).

Specie1	Specie2	Fst	Sig
<i>Q. frainetto</i>	<i>Q. petraea</i>	0.165	0.001
<i>Q. frainetto</i>	<i>Q. pub.</i>	0.115	0.001
<i>Q. petraea</i>	<i>Q. pub.</i>	0.122	0.001

Tab. 5.7 Risultati dell'analisi dell'AMOVA pairwise effettuata su 746 individui puri delle tre popolazioni studiate.

## 5.8 Cluster analysis

Per quanto riguarda il popolamento misto di Monte Vairano, è stata effettuata l'analisi di classificazione mediante UPGMA sulla matrice di distanza genetica di Nei (Nei *et al.*, 1983). L'analisi è stata condotta per confrontare la composizione genetica dei singoli stand e la ripartizione dei genotipi negli ibridi dei singoli stand (fig 5.10.A, 5.10.B). Gli stand MV1, MV3, MV5, MV6 e MV9, essendo costituiti principalmente da *Q. petraea* si rivelano geneticamente più vicini tra loro e formano due gruppi con gli stand MV02, MV04 e MV07 che mostrano una maggiore presenza di *Q. frainetto*. Lo stand MV08, costituito quasi esclusivamente da *Q. pubescens*, forma un gruppo geneticamente lontano e separato dai primi due (fig.5.10.A). E' stata effettuata una ulteriore cluster analysis (UPGMA; standard genetic distance, Nei 1987) anche sulla ripartizione genotipica all'interno degli ibridi identificati

nell'area. Quest'analisi è stata realizzata per indagare le similarità nella struttura genetica dei genotipi ibridi fra i singoli stand. L' UPGMA è stata effettuata all'interno della matrice del gruppo di ibridi di ogni stand ed ha rivelato che le principali differenziazioni genetiche si ritrovano ancora nello stand MV08, marcatamente distante dagli altri, a causa dell'elevato contributo di *Q. pubescens* e per la totale assenza del genotipo di *Q. frainetto*. Tutti gli altri stand, anche se hanno rivelato una composizione eterogenea, risultano geneticamente più vicini (fig.5.10.B).

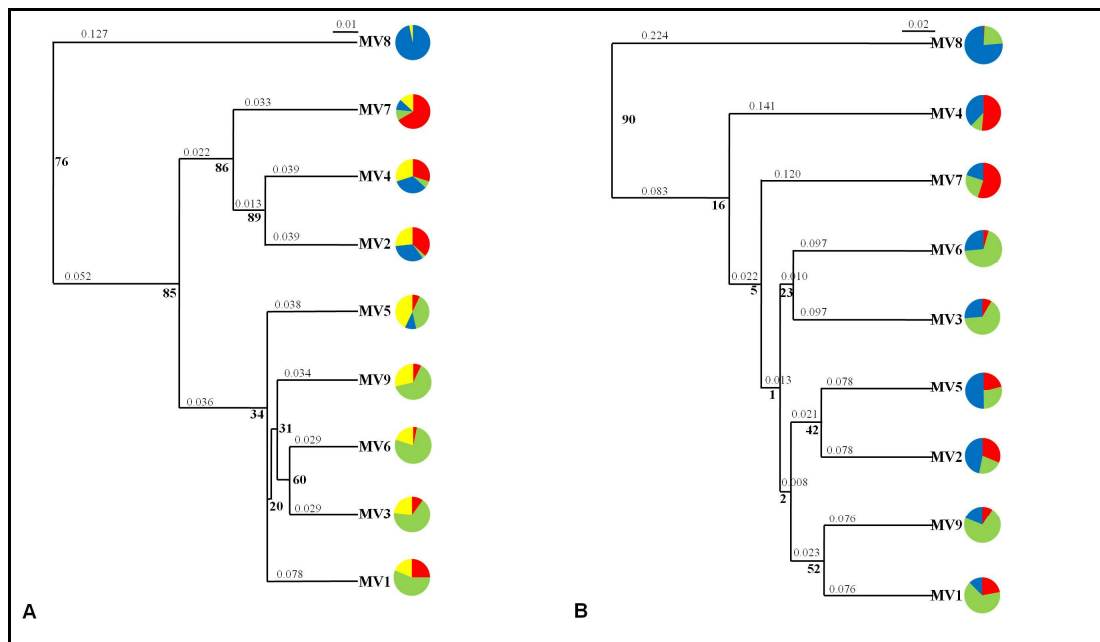


Figura 5.10. Dendrogramma ottenuto dall'analisi UPGMA effettuata sulla matrice di distanza genetica (Nei *et al.*, 1983) dei campioni molisani di Monte Vairano. A: composizione genotipica dei singoli stand. B: la ripartizione dei genotipi negli ibridi dei singoli stand (bootstrap ottenuto con 999 permutazioni random).



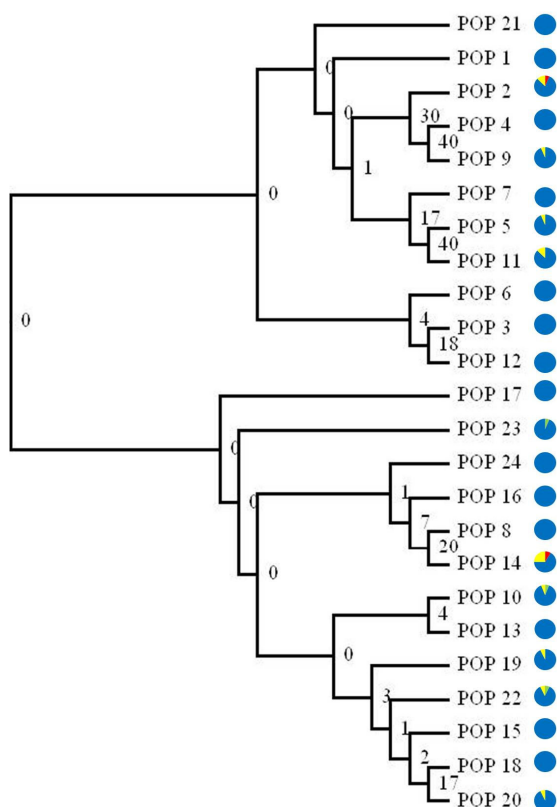


Figura 5.11. Dendrogramma ottenuto dall'analisi UPGMA effettuata sulla matrice di distanza genetica (Nei *et al.*, 1983) tra la composizione genotipica dei singoli stand pugliesi (bootstrap ottenuto con 999 permutazioni random).

E' stata poi effettuata una cluster analysis degli stand di *Q. pubescens* campionati in Puglia per confrontarne la composizione genotipica (fig. 5.11). Gli stand si raggruppano principalmente in due cluster: il primo cluster raggruppa stand principalmente di provenienza eterogenea: stand n. 21 e n. 1 (Murge), n. 2, n. 4 e n. 9 (Sud Appennino Dauno), n. 7, n. 5 e n. 11 (Sud Appennino Dauno e Gargano), n. 6, n. 3 e n. 12 (Sud Appennino Dauno, Costa Salentina e Gargano - fig. 5.12).

Il secondo cluster si suddivide in due ulteriori cluster: a un primo gruppo appartengono stand di provenienza eterogenea: stand n. 17, n. 23, n. 24, n. 16, n. 8 e n. 14 (Sud Appennino Dauno, Costa Salentina e Gargano) mentre ad un secondo gruppo appartengono i restanti stand, tutti di provenienza dell'area delle Murge (stand n. 20, n. 18, n. 15, n.22, n. 19, n. 13 e n. 10).

La cluster analysis mostra inoltre che gli individui ibridi e gli individui puri non appartenenti a *Q. pubescens* si distribuiscono in maniera eterogenea nei cluster individuati (fig. 5.12). L' UPGMA ha evidenziato ancora una volta che tutti gli stand di *Q. pubescens* campionati in Puglia risultano geneticamente vicini: il dendrogramma costruito sulla base della matrice delle

distanze di Nei presenta bassissimi valori di bootstrap ai nodi (figura 5.12) e in nessun caso il nodo è “robusto” e quindi non indica differenze significative tra i rami (stand).

## **5.6 Analisi delle frequenze alleliche**

Per ogni locus sono stati calcolati (GenAlex 6.4., FSTAT 2.9.3) i principali parametri di diversità genetica intra-popolazione come il numero di alleli effettivi ( $N_e$ ), l'eterozigosità osservata ( $H_o$ ) e attesa ( $H_e$ ) e il coefficiente di inbreeding ( $F$ ). I valori sono stati calcolati sia all'interno dell'intero campione di *Q. pubescens* (analisi intra-specifica) che tra le tre popolazioni dell'area simpatica di Monte Vairano (analisi inter-specifica).

### **5.6.1 Analisi delle frequenze alleliche intra-specifica**

Per calcolare la diversità genetica all'interno di *Q. pubescens* è stata creata una matrice con 516 campioni puri (provenienza: Lazio, Molise, Puglia) e sottoposta ad analisi delle frequenze alleliche. I valori ottenuti nei 32 stand in cui è presente *Q. pubescens*, sono indicati nella Tabella 5.8.

La popolazione di *Q. pubescens* che mostra i più alti valori di diversità genetica è quella di Monte Vairano – stazione 32, Molise ( $N_a$ : 9.083,  $N_e$ : 5.010 e  $I$ : 2.095, tab 5.8). I campioni delle stazioni laziali presentano anch'essi valori sopra la media (tab 5.8) mentre solo la metà degli stand pugliesi presenta valori sensibilmente sopra la media (staz. 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 20, 21 e 22, tab 5.8). Anche i valori medi dell'eterozigosità osservata e attesa sono più elevati nelle stazioni di campionamento laziali e in quella molisana rispetto agli stand pugliesi. Non si riscontrano deficit di eterozigosità in tutte le stazioni campionate e, in accordo con gli indici di eterozigosità osservati, la media degli indici di fissazione risulta bassa nelle diverse aree indagate con valori sensibilmente più bassi nelle aree del Lazio e del Molise (tab 5.8). Su un totale di 32 popolazioni, sono stati evidenziati 13 alleli esclusivi (tab 5.10) con frequenze che vanno da 0.012 (pop. 32 – Monte Vairano) a 0.077 (pop 23 – staz. 24, Puglia). Di questi, 6 alleli esclusivi sono stati evidenziati nei campioni pugliesi, rispettivamente nelle aree del Gargano e delle Murge con frequenze che vanno da 0.033 a 0.077 (tab 5.9). Altri cinque alleli esclusivi sono stati rivenuti nei campioni laziali (Staz. San, Tor, Mar, Acu e Pda) con frequenze che vanno da 0.022 a 0.028. Nell'area molisana di Monte Vairano sono infine stati evidenziati due alleli esclusivi di *Q. pubescens* con una frequenza, rispettivamente, di 0.012 e 0.023 (tab 5.9). Il grafico in figura 5.13 mostra l'andamento degli indici di diversità genetica nell'intero campione di *Q. pubescens* nelle 32 stazioni di campionamento.

Stand		Na	Na	Ne	I	Ho	He	UHe	F
Stand_1	Mean	14.833	6.417	3.671	1.363	0.574	0.617	0.639	0.038
	SE	0.613	0.773	0.502	0.190	0.074	0.080	0.083	0.040
Stand_2	Mean	12.083	4.750	3.111	1.109	0.501	0.550	0.574	0.050
	SE	0.570	0.708	0.513	0.183	0.081	0.079	0.082	0.079
Stand_3	Mean	5.417	3.750	2.809	1.039	0.582	0.553	0.611	-0.090
	SE	0.193	0.463	0.370	0.149	0.078	0.070	0.078	0.094
Stand_4	Mean	14.250	5.083	3.168	1.139	0.492	0.535	0.555	0.117
	SE	0.827	0.690	0.567	0.187	0.099	0.080	0.083	0.096
Stand_5	Mean	13.917	6.333	3.595	1.363	0.536	0.627	0.651	0.140
	SE	0.596	0.801	0.625	0.161	0.077	0.057	0.059	0.096
Stand_6	Mean	14.583	5.667	3.566	1.305	0.616	0.633	0.656	0.019
	SE	0.260	0.801	0.595	0.161	0.076	0.056	0.058	0.089
Stand_7	Mean	14.500	5.250	3.015	1.214	0.538	0.591	0.613	0.105
	SE	0.359	0.592	0.403	0.137	0.086	0.056	0.058	0.092
Stand_8	Mean	15.667	5.917	3.456	1.237	0.580	0.569	0.588	-0.016
	SE	0.333	0.949	0.626	0.203	0.105	0.081	0.084	0.094
Stand_9	Mean	14.500	6.667	4.323	1.449	0.582	0.650	0.673	0.117
	SE	0.230	0.847	0.782	0.186	0.074	0.067	0.070	0.060
Stand_10	Mean	14.750	6.167	3.877	1.440	0.591	0.685	0.709	0.172
	SE	0.131	0.737	0.514	0.139	0.085	0.042	0.043	0.100
Stand_11	Mean	13.833	6.333	3.844	1.407	0.621	0.656	0.680	0.065
	SE	0.112	0.782	0.570	0.163	0.079	0.058	0.060	0.084
Stand_12	Mean	15.500	6.250	3.378	1.339	0.675	0.622	0.643	-0.062
	SE	0.230	0.789	0.468	0.159	0.090	0.060	0.062	0.087
Stand_13	Mean	14.250	6.000	3.822	1.393	0.613	0.664	0.688	0.081
	SE	0.392	0.749	0.579	0.148	0.076	0.052	0.054	0.082
Stand_14	Mean	7.083	4.333	3.026	1.132	0.483	0.575	0.619	0.159
	SE	0.193	0.512	0.439	0.152	0.093	0.068	0.073	0.128
Stand_15	Mean	14.250	6.083	3.751	1.382	0.656	0.655	0.680	-0.003
	SE	0.641	0.645	0.529	0.147	0.071	0.057	0.059	0.071
Stand_16	Mean	11.333	5.417	3.195	1.276	0.582	0.616	0.645	0.060
	SE	0.256	0.417	0.398	0.123	0.063	0.056	0.059	0.041
Stand_17	Mean	9.250	5.500	3.527	1.354	0.606	0.659	0.698	0.064
	SE	0.279	0.500	0.396	0.128	0.085	0.052	0.056	0.107
Stand_18	Mean	12.333	6.167	3.670	1.386	0.588	0.644	0.672	0.106
	SE	0.225	0.726	0.505	0.161	0.077	0.063	0.066	0.075
Stand_19	Mean	11.250	5.833	3.581	1.365	0.587	0.641	0.672	0.079
	SE	0.524	0.562	0.461	0.150	0.083	0.065	0.068	0.088
Stand_20	Mean	12.333	6.750	3.940	1.477	0.596	0.676	0.705	0.128
	SE	0.355	0.827	0.493	0.155	0.073	0.060	0.062	0.064
Stand_21	Mean	6.250	5.167	3.521	1.385	0.767	0.684	0.746	-0.133
	SE	0.250	0.405	0.261	0.099	0.063	0.040	0.044	0.071
Stand_22	Mean	11.667	6.417	4.301	1.465	0.634	0.670	0.700	0.026
	SE	0.188	0.753	0.639	0.175	0.067	0.069	0.072	0.053
Stand_23	Mean	13.583	5.500	3.632	1.361	0.592	0.675	0.701	0.132
	SE	0.336	0.597	0.437	0.120	0.061	0.040	0.042	0.062
Stand_24	Mean	10.250	4.917	2.838	1.140	0.529	0.564	0.593	0.102
	SE	0.351	0.557	0.401	0.136	0.105	0.060	0.063	0.136
Cor (25)	Mean	22.417	7.250	4.137	1.565	0.711	0.711	0.727	0.018
	SE	0.690	0.653	0.417	0.131	0.067	0.047	0.048	0.072
Pda (26)	Mean	21.667	8.167	4.411	1.643	0.696	0.724	0.742	0.041
	SE	0.801	0.638	0.494	0.131	0.056	0.046	0.047	0.049
Acu (27)	Mean	21.417	7.250	4.346	1.585	0.695	0.729	0.747	0.055
	SE	1.076	0.698	0.509	0.122	0.063	0.035	0.036	0.070
Tor (28)	Mean	18.250	7.250	4.010	1.548	0.711	0.707	0.727	0.002
	SE	0.372	0.617	0.480	0.115	0.050	0.037	0.038	0.035
San (29)	Mean	18.250	7.167	4.452	1.585	0.714	0.717	0.737	0.021
	SE	0.218	0.726	0.496	0.146	0.066	0.054	0.056	0.065
Mar (30)	Mean	24.250	7.167	3.890	1.486	0.687	0.689	0.704	-0.013
	SE	0.305	0.806	0.411	0.139	0.054	0.052	0.053	0.050
Cas (31)	Mean	20.083	6.917	3.880	1.474	0.661	0.678	0.695	0.019
	SE	0.358	0.668	0.438	0.145	0.066	0.059	0.061	0.048
MVairano (32)	Mean	41.917	9.083	5.010	1.693	0.708	0.727	0.735	0.035
	SE	0.358	0.908	0.645	0.166	0.065	0.062	0.063	0.046
Total	Mean	15.185	6.154	3.711	1.378	0.616	0.647	0.673	0.051
	SE	0.341	0.130	0.090	0.027	0.013	0.010	0.011	0.014

Tab. 5.8. Caratteristiche degli alleli per locus e popolazione di *Q.pubescens*: da 1 a 24 stand dei campioni raccolti nella regione Puglia, da 25 a 31 stand dei campioni raccolti nella regione Lazio, stand n.32: dei campioni raccolti nella regione Molise. (N: numero di individui, Na: media allelica per locus; Ne: numero di alleli effettivi ; I: Information index; Ho: Eterozigosità Osservata; He: Eterozigosità Attesa; Uhe: Eterozigosità Attesa Imparziale; F: Indice di Fissazione).

<b>Pop</b>	<b>Locus</b>	<b>Allele</b>	<b>Freq</b>
Pop5	Pie215	185	0,063
Pop6	Pie223	234	0,033
Pop13	Pie271	200	0,033
Pop17	Pie243	206	0,063
Pop20	Pie258	159	0,042
Pop23	Pie242	132	0,077
Pop26	Pie267	80	0,022
Pop27	Pie020	119	0,022
Pop28	Pie227	175	0,026
Pop29	Pie152	262	0,028
Pop31	Pie239	96	0,025
Pop32	Pie102	147	0,023
Pop32	Pie215	221	0,012

Tab. 5.9: Frequenza e localizzazione degli alleli privati presenti nell'intero campione di *Q.pubescens*.

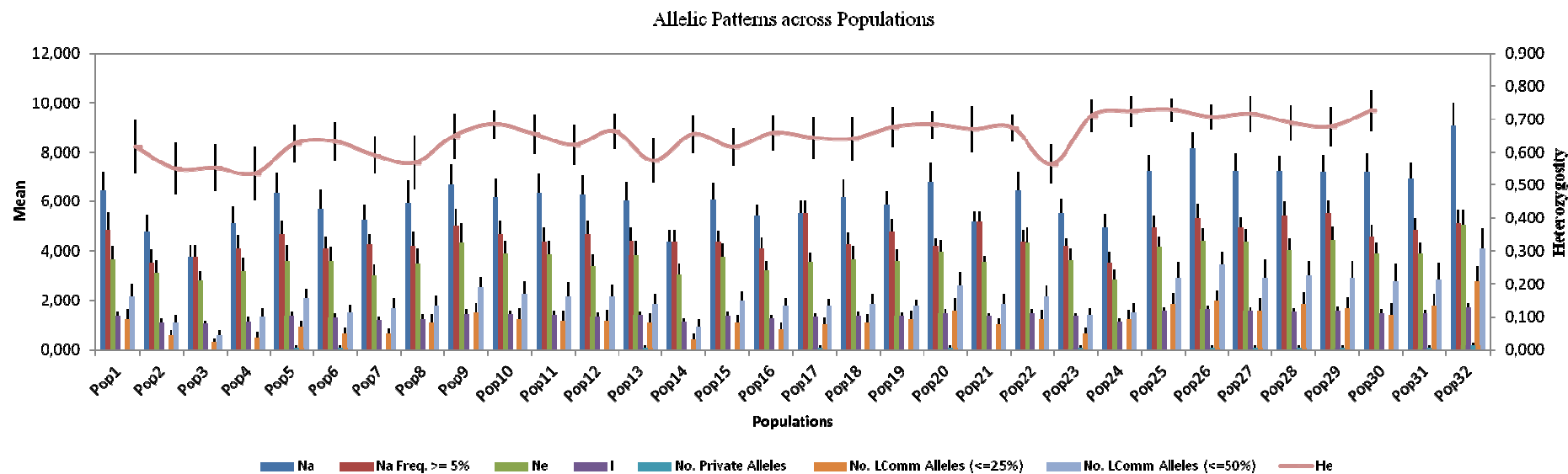


Fig. 5.13: Indici di diversità genetica negli stand di *Q. pubescens*: da 1 a 24 stand dei campioni raccolti nella regione Puglia, da 25 a 31 stand dei campioni raccolti nella regione Lazio, stand n.32: stand dei campioni raccolti nella regione Molise. (N: numero di individui, Na: media allelica per locus; Ne: numero di alleli effettivi; I: Information index; Ho: Eterozigotità Osservata; He: Eterozigotità Attesa; Uhe: Eterozigotità Attesa Imparziale; F: Indice di Fissazione).

### 5.6.2 Lazio

I valori medi dell'eterozigosità osservata e attesa nei campioni analizzati risultano essere, rispettivamente, 0.696 e 0.708 (stand 25-31 tab. 5.8). I risultati non mostrano deficit di eterozigosità nelle popolazioni analizzate e il coefficiente di inbreeding (F) si attesta su un valore medio di 0.020. Nel grafico 5.13, la distribuzione dei parametri di diversità genetica relativa alle 7 stazioni di campionamento mostra i valori che discostano sensibilmente tra loro e non si rilevano sostanziali differenziazioni nelle aree indagate in questa regione.

Per quanto riguarda la presenza di alleli privati nei campioni laziali (allele che è presente in un solo stand e assente negli altri) ne sono stati individuati 19 con frequenze che vanno da 0.021 (Tor) a 0.059 (Pda). Di questi 5 sono esclusivi, ossia assenti negli stand di provenienza molisana e pugliese (tab 5.12). Relativamente agli alleli privati in comune con gli stand molisani e pugliesi, si osserva che:

- l'allele 128 in Pie242 è in comune con alcuni campioni esaminati negli stand n. 2 e n. 16 in Puglia.
- l'allele 102 in Pie242 è in comune con alcuni stand Pugliesi (stand n. 6, n. 14 e n. 16).
- l'allele 97 in Pie020, è invece molto comune negli stand pugliesi (stand n. 2, n. 16, n. 17, n. 19, n. 21, n. 23 e n. 24) mentre risulta assente nei campioni di *Q. pubescens* in Molise.
- l'allele 86 in Pie267 è in comune con gli stand pugliesi n. 1, n. 16, n. 18, n. 20 e n. 22.
- l'allele 215 in Pie215 è in comune sia con i campioni di uno stand molisano (MV2) che con i seguenti stand pugliesi: n. 3, n. 4, n. 16, n. 19, n. 21, n. 22 e n. 23.
- l'allele 106 in Pie242 è in comune sia con i campioni di uno stand molisano (MV4) che con i seguenti stand pugliesi: n. 5, n. 6, n. 8, n. 9, n. 11, n. 15, n. 21 e n. 22.
- l'allele 31 in Pie102 è in comune sia con i campioni dello stand molisano MV8 che con i seguenti stand pugliesi: n. 1, n. 12, n. 18 e n. 24.
- l'allele 132 in Pie258 è in comune con alcuni campioni esaminati negli stand n. 2 e n. 9 in Puglia.
- l'allele 188 in Pie215 è in comune con alcuni campioni esaminati nello stand molisano MV8 e n. 1 in Puglia.
- l'allele 157 in Pie258 è in comune sia con i campioni degli stand molisani MV2 ed MV8 che con i seguenti stand pugliesi: n. 9, n. 12, n. 23 e n. 24.
- l'allele 69 in Pie258 è in comune con lo stand molisano MV7.

- l'allele 161 in Pie102, è molto comune negli stand pugliesi (stand n. 1, n. 4, n. 9, n. 10, n. 11, n.12, n. 14, n.19, n. 20, n. 22, n. 24) mentre risulta assente nei campioni di *Q.pubescens* in Molise.
- l'allele 218 in Pie215 è in comune con gli stand Pugliesi n. 18 e 22.

Pop	Locus	Allele	Freq	Esclusivo
San	Pie242	128	0.022	
San	Pie267	80	0.022	x
San	Pie258	153	0.028	
Tor	Pie020	97	0.022	
Tor	Pie020	119	0.022	x
Tor	Pie267	86	0.021	
Tor	Pie215	215	0.029	
Mar	Pie242	106	0.026	
Mar	Pie102	165	0.053	
Mar	Pie258	132	0.033	
Mar	Pie215	188	0.026	
Mar	Pie227	175	0.026	x
Acu	Pie152	262	0.028	x
Acu	Pie258	157	0.059	
Cor	Pie152	260	0.022	
Cor	Pie239	69	0.040	
Pda	Pie102	161	0.050	
Pda	Pie215	218	0.024	
Pda	Pie239	96	0.025	x

Tab. 5.12: Frequenza e localizzazione degli Alleli privati presenti in ogni popolazione laziale analizzata.

### 5.6.3 Puglia

La tabella 5.8 mostra i valori dei parametri diversità genetica all'interno delle singole stazioni di campionamento degli stand pugliesi. I valori medi dell'eterozigosità osservata e attesa in tutti gli stand analizzati risultano essere, rispettivamente, 0.588 e 0.626. Anche in questo caso non si evidenziano deficit di eterozigosità e il coefficiente di inbreeding (F) si attesta su un valore medio di 0.061. Nel grafico 5.13 la distribuzione dei parametri di diversità genetica relativa alle 24 stazioni di campionamento mostra un andamento dei valori sensibilmente eterogeneo.

In termini di alleli privati, 10 stand pugliesi (tab. 5.14) presentano almeno un allele privato; in totale sono stati rilevati 12 alleli privati in tutte le aree campionate: di questi 6 risultano essere esclusivi dei campioni pugliesi, mentre gli altri 6 sono in comune con alcuni campioni raccolti in Lazio o in Molise, o in entrambe le regioni.

Pop	Locus	Allele	Freq	Esclusivo
Pop1	Pie215	188	0.045	
Pop5	Pie215	185	0.063	x
Pop6	Pie223	234	0.033	x
Pop13	Pie242	102	0.036	
Pop13	Pie271	200	0.033	x
Pop15	Pie152	260	0.036	
Pop17	Pie243	206	0.063	x
Pop19	Pie267	106	0.083	
Pop20	Pie258	159	0.042	x
Pop21	Pie020	113	0.100	
Pop21	Pie020	115	0.200	
Pop23	Pie242	132	0.077	x

Tab. 5.14: Frequenza e localizzazione degli alleli privati presenti negli stand pugliesi.

In dettaglio:

- l'allele 188 in Pie215 è in comune sia con il Lazio (stand Mar) che con il Molise, dove è abbastanza frequente ( stand MV06 ed MV08).
- l'allele 102 in Pie242 è in comune sia con il Lazio (stand Cas, San, Tor e Acu) che con il Molise (stand MV7 e MV8).
- l'allele 260 in Pie152 è in comune solo con il Lazio (stand Cor - allele privato).
- l'allele 106 in Pie267 è in comune solo con il Molise (stand MV02 - allele privato).
- l'allele 113 in Pie020 è in comune solo con il Lazio (stand San e Mar).
- l'allele 115 in Pie020 è in comune solo con il Molise (stand MV7 e MV8).

### 5.7 Analisi delle frequenze alleliche inter-specifica

L'analisi delle frequenze alleliche inter-specifica è stata condotta nelle popolazioni parentali di *Q. frainetto*, *Q. petraea* e *Q. pubescens* dell'area simpatica di Monte Vairano (Cb). Nella tabella 5.15 sono indicati gli alleli individuati in quest'area e, negli istogrammi riportati nella sezione allegati (Fig. 13÷24), l'andamento delle frequenze alleliche per locus per popolazione. I risultati mostrano la presenza di 138 alleli nelle tre specie indagate (Tab. 5.15). La taglia degli alleli è compresa tra 69 e 260 bp con una media di 12,54 bp per locus. Il locus Pie152 ha mostrato un maggior grado di polimorfismo, con 18 alleli, seguito da Pie102, con 16 alleli e Pie 258 con 14 alleli. Il locus Pie 227 ha rivelato un minor polimorfismo con 4 forme alleliche. Dal numero di forme alleliche, si evidenzia un minor numero di alleli totali rilevati rispetto al campione totale (tab 5.4) con sensibili differenze nei singoli locus. Dagli istogrammi sulle frequenze alleliche per locus per popolazione (Fig. 13÷24 sezione allegati)



risalta il diverso polimorfismo dei loci: i grafici mostrano le frequenze alleliche dei singoli locus nelle corrispondenti 3 specie indagate. La forma allelica più frequente riscontrata per *Q. pubescens* è l'allele 71 del locus Pie239 (87.9%), seguono l'allele 156 locus Pie (64.4%), l'allele 223 locus Pie216 (54.5 %), l'allele 243 locus Pie216 (44.3%) e l'allele 102 Pie020 (34.7%).

alleles	PIE020	PIE223	PIE152	PIE242	PIE102	PIE243	PIE267	PIE258	PIE215	PIE239	PIE227	PIE271
97	197	228	102	139	206	86	128	185	69	156	184	
99	200	230	104	141	210	90	130	188	71	159	186	
101	203	232	106	143	212	92	134	191	73	162	188	
103	206	234	108	145	214	96	136	194	75	165	190	
105	209	236	110	147	216	98	138	197	77		192	
107	212	238	112	149	218	100	140	200	79		194	
109	216	240	114	151	220	102	143	203	81		196	
113	219	242	116	153	222	104	145	206	85		198	
115	222	244	118	155		106	147	209	87		200	
	225	246	120	157			149	212	89		202	
	228	248	122	159			151	215	91		204	
		250	124	161			153	218	93			
		252		163			155	221	94			
		254		165			157					
		256		167								
		258		169								
		259										
		260										
tot 138	9	11	18	12	16	8	9	14	13	13	4	11

Tab. 5.15. Forme alleliche (in bp) individuate nei campioni molisano dell'area di Monte Vairano.

La forma allelica più frequente per *Q. frainetto* è l'allele 156 locus Pie 227 (85.1%), seguono l'allele 101 locus Pie020 (66.6%), l'allele 216 locus Pie243 (44.3%) e l'allele 200 locus Pie215 (40.9%). La forma allelica più frequente riscontrata per *Q. petraea* è l'allele 156 locus Pie227 (82.7%), seguono l'allele 149 locus Pie102 (57.9 %), l'allele 232 locus Pie152 (54.8%) e l'allele 96 Pie267 (52.2%) (Fig. 13÷24 sezione allegati). Nei campioni analizzati sono stati evidenziati 10 alleli privati (Tabella 5.16) con una frequenza di 0.18 per *Q. frainetto*, 0,55 per *Q. petraea*, 0.55 per *Q. pubescens* e 0.66 nel gruppo degli ibridi (Tabella 5.17).

Stand	Locus	Allele	Freq
MV01	Pie020	97	0.031
MV01	Pie152	260	0.032
MV02	Pie020	113	0.017
MV02	Pie243	224	0.023
MV02	Pie267	106	0.017
MV03	Pie243	208	0.017
MV04	Pie239	83	0.017
MV05	Pie267	86	0.017
MV06	Pie239	94	0.017
MV07	Pie215	221	0.017

Tab. 5.16: Frequenza e localizzazione degli Alleli privati presenti nell'area studio di Monte Vairano.

Species	N <sub>a</sub>	N <sub>a</sub> Freq. ≥5%	N <sub>e</sub>	I	Private alleles	R <sub>s</sub>	H <sub>e</sub>	H <sub>o</sub>	F <sub>is</sub>
<i>Q. frainetto</i>	6.64	4.09	3.28	1.36	0.18	6.53	0.65	0.63	0.04
<i>Q. petraea</i>	9.00	4.55	4.10	1.52	0.55	7.90	0.69	0.67	0.01
<i>Q. pubescens</i>	9.46	4.91	4.82	1.68	0.55	9.22	0.72	0.72	0.001
hybrids	10.0	5.00	4.90	1.73	0.36	9.55	0.74	0.72	0.04

Tab. 5.17. Diversità genetica delle 3 specie dell'area di studio di Monte Vairano e dei loro ibridi. (N: numero di individui, N<sub>a</sub>: media allelica per locus; N<sub>e</sub>: numero di alleli effettivi ; I: Information index; R<sub>s</sub>: ricchezza allelica ottenuta con un indice di rarefazione su 46 individui diploidi; H<sub>o</sub>: Eterozigosità Osservata; H<sub>e</sub>: Eterozigosità Attesa; U<sub>h</sub>: Eterozigosità Attesa Imparziale; F: Indice di Fissazione ottenuto con 9999 bootstraps degli individui nelle specie).

Per quanto riguarda i valori dei parametri di diversità genetica inter-specifica nell'area, i valori medi dell'indice di fissazione (F) sono risultati generalmente bassi, ma un locus (Pie258) ha mostrato un valore di F più elevato in tutte e tre le specie (FPie258=0.230 in *Q. frainetto*, FPie258=0.246 in *Q. petraea*, FPie258=0.366 in *Q. pubescens*). Sulla base di questo risultato è stata verificata la presenza di alleli nulli nel campione complessivo utilizzando il programma “Micro-checker 2.2.3” (Van Oosterhout *et al.* 2004). Il test ha rivelato che i valori più alti del coefficiente di inbreeding riscontrati nel locus Pie258 derivano effettivamente dalla presenza di alleli nulli, per questo motivo, per la sola area campione di Monte Vairano, si è deciso di escludere questo locus dalle analisi successive. I risultati H<sub>e</sub> mostra valori (Tab.5.16) che vanno da un minimo di 0.201 (Pie227) a un massimo di 0.893 (Pie152).

Per gli individui di *Q. frainetto* il locus Pie242 mostra i più alti valori di diversità allelica (N<sub>e</sub>: 6.722 e I: 2.032); in *Q. petraea* i più alti valori di ricchezza allelica si hanno per il locus Pie242 (N<sub>e</sub>: 7.248 e I: 2.121) e in *Q. pubescens* per il locus Pie152 (N<sub>e</sub>: 9.379 e I: 2.389). I valori medi dell'eterozigosità osservata e attesa risultano essere, rispettivamente, di 0.633 e 0.650 per *Q. frainetto*, 0.676 e 0.689 per *Q. petraea* e 0.718 e 0.430 per *Q. pubescens* (tab. 5.16): non si riscontrano deficit di eterozigosità e, in accordo con gli indici di eterozigosità osservati, la media degli indici di fissazione risulta bassa per tutte e tre le specie indagate (*Q. frainetto*: 0.035, *Q. petraea*: 0.011 e *Q. pubescens*: 0.001 tab. 5.16.). Per quanto riguarda il gruppo degli individui ibridi, questi hanno mostrato elevati valori di diversità genetica per il Locus Pie152 (N<sub>e</sub>: 9.690 e I: 2.247) con valori medi di N<sub>e</sub> pari a 4.902 e di I pari a 1.728; i valori medi dell'eterozigosità osservata (H<sub>e</sub>) ed attesa (H<sub>o</sub>) risultano essere 0.718 ed 0.743 (tab. 5.16).

Species	Locus	N	Na	Ne	I	Ho	He	UHe	F
<i>Q. frainetto</i>	PIE020	56	3	2.463	0.970	0.571	0.594	0.599	0.038
	PIE223	55	6	3.680	1.503	0.582	0.728	0.735	0.201
	PIE152	54	7	2.471	1.243	0.593	0.595	0.601	0.005
	PIE242	56	10	6.722	2.032	0.875	0.851	0.859	-0.028
	PIE102	56	9	2.779	1.474	0.679	0.640	0.646	-0.060
	PIE243	46	6	3.260	1.427	0.674	0.693	0.701	0.028
	PIE267	54	6	2.957	1.354	0.704	0.662	0.668	-0.063
	PIE215	55	8	3.436	1.477	0.727	0.709	0.715	-0.026
	PIE239	55	7	2.840	1.322	0.673	0.648	0.654	-0.038
	PIE227	54	3	1.390	0.486	0.222	0.281	0.283	0.208
	PIE271	56	8	4.041	1.653	0.661	0.753	0.759	0.122
	Mean	54.273	6.636	3.276	1.358	0.633	0.650	0.656	0.035
	SE	0.864	0.664	0.405	0.118	0.048	0.043	0.044	0.030
<i>Q. petraea</i>	PIE020	96	7	3.555	1.389	0.688	0.719	0.722	0.043
	PIE223	96	11	2.825	1.520	0.688	0.646	0.649	-0.064
	PIE152	89	14	6.930	2.183	0.742	0.856	0.861	0.133
	PIE242	96	11	7.248	2.121	0.802	0.862	0.867	0.070
	PIE102	95	11	4.054	1.635	0.726	0.753	0.757	0.036
	PIE243	92	6	3.202	1.353	0.663	0.688	0.691	0.036
	PIE267	96	6	4.074	1.469	0.698	0.755	0.759	0.075
	PIE215	96	12	5.333	1.932	0.885	0.813	0.817	-0.090
	PIE239	96	8	1.174	0.398	0.156	0.148	0.149	-0.053
	PIE227	77	4	2.294	1.037	0.571	0.564	0.568	-0.013
	PIE271	96	9	4.398	1.660	0.813	0.773	0.777	-0.052
	Mean	93.182	9	4.099	1.518	0.676	0.689	0.692	0.011
	SE	1.757	0.924	0.557	0.152	0.058	0.060	0.061	0.021
<i>Q. pubescens</i>	PIE020	55	7	1.877	0.943	0.527	0.467	0.471	-0.129
	PIE223	55	9	5.515	1.899	0.818	0.819	0.826	0.001
	PIE152	53	14	9.379	2.389	0.868	0.893	0.902	0.028
	PIE242	55	11	6.700	2.045	0.891	0.851	0.859	-0.047
	PIE102	55	13	5.402	2.047	0.782	0.815	0.822	0.041
	PIE243	52	7	3.702	1.526	0.827	0.730	0.737	-0.133
	PIE267	54	6	4.142	1.525	0.722	0.759	0.766	0.048
	PIE215	55	11	4.082	1.790	0.745	0.755	0.762	0.013
	PIE239	54	13	5.006	1.977	0.741	0.800	0.808	0.074
	PIE227	55	4	1.252	0.445	0.182	0.201	0.203	0.096
	PIE271	55	9	5.926	1.887	0.818	0.831	0.839	0.016
	Mean	54.364	9.455	4.817	1.679	0.720	0.720	0.727	0.001
	SE	0.310	0.976	0.675	0.167	0.061	0.062	0.062	0.023
hybrids	PIE020	61	9	2.829	1.308	0.623	0.646	0.652	0.036
	PIE223	61	11	6.249	2.062	0.836	0.840	0.847	0.005
	PIE152	57	14	7.690	2.247	0.825	0.870	0.878	0.052
	PIE242	61	12	8.352	2.251	0.934	0.880	0.888	-0.062
	PIE102	61	15	6.171	2.112	0.705	0.838	0.845	0.159
	PIE243	57	8	3.067	1.436	0.684	0.674	0.680	-0.015
	PIE267	60	6	4.157	1.536	0.783	0.759	0.766	-0.031
	PIE215	61	11	4.975	1.881	0.705	0.799	0.806	0.118
	PIE239	60	11	3.009	1.580	0.650	0.668	0.673	0.026
	PIE227	51	4	1.575	0.722	0.314	0.365	0.369	0.141
	PIE271	61	9	5.855	1.871	0.836	0.829	0.836	-0.008
	Mean	59.182	10	4.902	1.728	0.718	0.743	0.749	0.038
	SE	0.942	0.982	0.653	0.141	0.049	0.045	0.046	0.022
Total	Mean	65.250	8.773	4.274	1.571	0.687	0.700	0.706	0.021
	SE	2.534	0.474	0.298	0.074	0.027	0.026	0.026	0.012

Tab. 5.16. Caratteristiche degli alleli individuati nell'area di studio di Monte Vairano. (N: numero di individui, Na: media allelica per locus; Ne: numero di alleli effettivi; I: Information index; Ho: Eterozigosità Osservata; He: Eterozigosità Attesa; Uhe: Eterozigosità Attesa Imparziale; F: Indice di Fissazione).

## Discussione dei risultati

e

## Conclusioni

Le ricerche condotte nel presente dottorato di ricerca hanno riguardato lo studio della variabilità genetica e l'analisi dei flussi genici in alcune popolazioni di specie parentali del genere *Quercus* attraverso l'utilizzo di marcatori genetici nucleari e codominanti (Est-SSR) appositamente sviluppati per questo scopo (Durand *et al.*, 2010, Guichoux *et al.*, 2011). Questo tipo di marcatori molecolari sono tra i più utilizzati nello studio della variabilità genetica delle querce bianche, e, il loro utilizzo, ci ha permesso di caratterizzare gli individui riconducendoli alle specie pure e identificando gli ibridi.

La scelta della PCR Multiplex si è rivelata una metodologia altamente funzionale e particolarmente conveniente in termini di tempo e di spesa. L'elevato numero di campioni ha permesso un'accurata analisi sia a livello inter-specifico che intra-specifico.

I risultati ottenuti dal dimensionamento allelico, hanno evidenziato che tutti i loci sono risultati polimorfici rivelando un totale di 161 alleli in 862 individui analizzati con un numero di alleli che varia da 7 (Pie227) a 19 (Pie152). Inoltre, la scelta di tali marcatori si è rivelata altamente funzionale, anche per *Q. frainetto* su cui non era mai stato testato precedentemente questo set di microsatelliti. L'analisi statistica Bayesiana ha portato all'individuazione di tre differenti genotipi, morfologicamente riconducibili a *Q. frainetto* Ten., *Q. petraea* Liebl. Matt. e *Quercus pubescens* Wild., inoltre è stata verificata la corrispondenza tra le assegnazioni genetiche e le caratteristiche morfologiche fogliari (Viscosi *et al.*, 2012; Fortini *et al.*, 2013) degli individui campionati nell'area simpatica di Monte Vairano (CB-Molise).

Le analisi biostatistiche hanno evidenziato sia l'esistenza di diversi livelli di differenziazione e sia la presenza di flusso genico tra le tre specie in quest'area. Dall'analisi delle componenti principali (PCA) effettuata sulla matrice di distanza di Nei (1983) è emersa una chiara separazione tra i tre genotipi (fig. 5.7); in particolare, *Q. pubescens* si separa dalle altre due specie lungo la prima componente principale, mentre la seconda componente principale spiega le differenze tra *Q. frainetto* e le altre due specie.

L'analisi della varianza molecolare (AMOVA) ha evidenziato che la variabilità genetica, nell'area di simpatia, è principalmente distribuita nelle specie (86%) e solo la restante porzione è relativa alle differenze tra le specie (fig. 5.9), che risultano tuttavia significative ( $F_{st}=0.136$ ;  $p<0.001$ ). L'AMOVA pairwise ha evidenziato che tutte le specie sono

significativamente differenziate, in particolare, il grado di differenziazione è simile tra *Q. petraea* – *Q. pubescens* ( $F_{st}=0.122$ ) e tra *Q. frainetto* – *Q. pubescens* ( $F_{st}=0.115$ ), mentre tra *Q. frainetto* – *Q. petraea* ( $F_{st}=0.165$ ) è emersa una maggiore differenziazione.

Questi risultati sono coerenti a quelli ottenuti in studi simili effettuati su queste tre specie in Europa, e, i diversi valori di differenziazione possono essere legati sia alla scelta dei loci, potenzialmente sotto selezione divergente (Enescu *et al.*, 2013), che alla tipologia ed alle caratteristiche dell'area di campionamento.

In particolare, in Curtu *et al.* (2006), nell'analisi di un popolamento misto di *Q. petraea*, *Q. robur*, *Q. pubescens* e *Q. frainetto* in Romania, viene evidenziato un  $F_{st}$  (0.096) significativo tra le quattro specie con una maggiore differenziazione tra *Q. robur* e *Q. frainetto* ( $F_{st}=0.168$ ), mentre minori differenze sono state evidenziate tra *Q. pubescens* e *Q. petraea* (0.045) e tra *Q. pubescens* e *Q. frainetto* (0.050); anche in un lavoro successivo di Curtu *et al.* (2011a) viene evidenziata una differenziazione significativa tra *Q. pubescens* e *Q. frainetto* ( $F_{st}=0.067$ ). In Fortini *et al.* (2009), la maggiore differenziazione è stata osservata tra *Q. robur* e *Q. frainetto* ( $F_{st}=0.242$ ), mentre *Q. petraea* e *Q. pubescens* ( $F_{st}=0.114$ ) hanno rivelato valori più bassi. In questo caso, le differenze fra *Q. frainetto* con *Q. petraea* ( $F_{st}=0.160$ ) sono risultate maggiori che con *Q. pubescens* ( $F_{st}=0.142$ ). In un recente lavoro di Salvini *et al.* (2009) si riporta una bassa ma significativa ( $F_{st}=0.076$ ) differenziazione genetica *Q. petraea* e *Q. pubescens*. Questo risultato suggerisce la presenza di una barriera riproduttiva interspecifica che contribuisce al mantenimento della specie, nonostante la presenza di flusso genico. Elevati valori di differenziazione genetica indicano una maggiore distanza filogenetica fra le coppie di specie mentre, bassi valori di differenziazione tra le specie possono essere spiegati con una maggiore presenza di flusso genico tra specie caratterizzate da recente divergenza (Curtu *et al.*, 2006).

Dall'analisi delle frequenze alleliche è emerso che la specie con maggiore polimorfismo, è *Q. pubescens* mentre gli altri due genotipi hanno mostrato livelli di polimorfismo espresso più bassi e simili tra loro (Tab. 5.17 e Fig. 5.18). I valori medi dell'eterozigosità osservata ( $H_o$ ) risultano essere elevati e non si riscontrano deficit di eterozigosità, inoltre la media degli indici di fissazione risulta bassa per tutte e tre le specie indagate, rilevando una buona variabilità genetica intra-specifica.

Complessivamente, *Q. petraea* e *Q. pubescens* presentano un maggior numero di alleli in comune rispetto a *Q. frainetto*, quest'ultima, caratterizzata anche da un minor numero di alleli privati. Nonostante l'elevato numero di alleli privati trovato in *Q. petraea* e *Q.*

*pubescens*, in queste specie è stato evidenziato un livello di differenziazione genetico simile se confrontate con *Q. frainetto*. L'elevato numero di alleli in comune tra queste due specie può indicare un flusso genico più intenso; al contrario il basso tasso di flusso genico tra *Q. frainetto* e le altre due specie può essere spiegato con la presenza di una parziale barriera riproduttiva tra *Q. frainetto* e *Q. petraea* e *Q. pubescens* (Curtu *et al.*, 2011).

Le analisi effettuate hanno così evidenziato la presenza di flusso genico fra i tre genotipi e come le tre specie pure coesistano nell'area, con un apprezzabile numero di individui ibridi. I risultati hanno infatti mostrato che l'area di Monte Vairano è caratterizzata da un'ampia porzione di individui puri (77.24%) e gli ibridi e gli introgressi rappresentano circa un quarto del campione analizzato. La specie predominante nell'area di studio è risultata *Q. petraea* (35.82% degli individui puri), seguita da *Quercus frainetto* (20.90%) e da *Q. pubescens* (20.52%). Per tutte e tre le specie è stata verificata la possibilità di formare ibridi in natura, e la percentuale complessiva di genotipi misti riscontrata nei singoli stand è risultata molto variabile (dal 3.33% al 30%). Ciò risulta fortemente legato a fattori ambientali e quindi alla distribuzione e alla densità delle specie parentali, oltre che all'influenza delle attività antropiche (Lepais *et al.*, 2009, Gerber *et al.* 2014). In particolare, in questo studio è stato evidenziato un alto livello di eterozigosità, nonché di differenziazione genetica tra le specie, rafforzando l'idea che gli individui puri risultano più adattati alle condizioni ambientali locali, mentre gli ibridi rispondono meglio a condizioni ambientali instabili e alle modifiche dell'habitat (Lepais *et al.* 2009).

L'analisi della composizione genetica degli stand ha mostrato che gli ibridi *Q. petraea* X *Q. pubescens* sono i più numerosi (10.82%) mentre gli altri sono meno frequenti. In particolare, gli ibridi *Q. frainetto* X *Q. petraea* sono tra i più rari (2.61%), mentre sono più comuni quelli *Q. frainetto* X *Q. pubescens* (5.97%). Infine, i genotipi introgressi di tutte e tre le specie sono risultati poco comuni (3.36%). Da ciò, *Q. petraea* e *Q. pubescens* sembrano ibridarsi maggiormente tra loro, mentre *Q. frainetto* mostra una minor affinità con entrambe le altre specie.

Ciò potrebbe essere legato all'abbondanza delle specie presenti sul territorio, dal momento che la composizione genetica di un ibrido può essere influenzata dalle dimensioni relative delle specie parentali coinvolte (Lepais, 2008). In Lepais (2008) viene infatti evidenziato che, una specie maggiormente diffusa sul territorio ha maggiori probabilità di produrre individui ibridi di una specie rara incidendo in maniera sostanzialmente diversa sull'introggressione direzionale o unidirezionale. Il grafico sottostante mostra infatti che, in specie comuni con

dimensioni confrontabili, l'introgressione è bidirezionale (3), mentre in individui rari (2) o piccoli popolamenti (4), l'introgressione è di tipo unilaterale o in disequilibrio direzionale (Lepais, 2008).

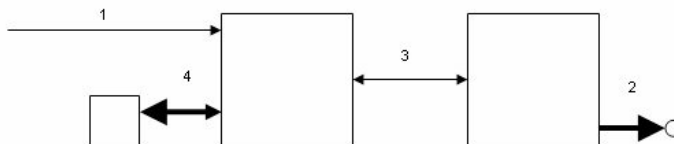


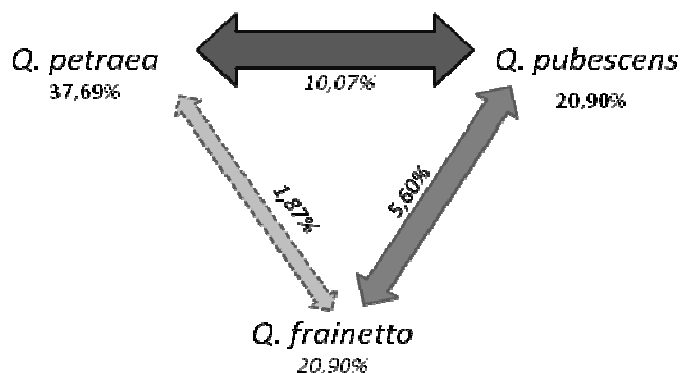
Fig. 6.1. Schema sintetico del flusso genico interspecifico in relazione alle dimensioni relative delle specie. Le forme rappresentano diverse specie di querce la cui dimensione è proporzionale alla loro efficacia riproduttiva (i quadratini rappresentano specie composte di molti individui, il cerchio rappresenta uno o pochi individui). Le frecce simboleggiano il flusso genico interspecifico. 1: ibridazione lunga distanza (dispersione del polline o la migrazione delle sementi); 2: ibridazione di una specie molto rara da specie comuni (introgressione unilaterale); 3: ibridazione tra le specie più comuni, introgressione bidirezionale (equilibrio); 4: ibridazione di una specie in minoranza con specie frequenti, introgressione direzionale (squilibrio). (da Lepais, Thèse de Docteur 2008).

Come già riportato da alcuni autori, i diversi livelli di flusso genico evidenziato tra le specie indagate (in particolare il minor tasso di ibridazione naturale tra *Q. frainetto* e le altre due specie), possono inoltre essere spiegati sulla base delle differenze nei tempi di fioritura dei tre genotipi (Curtu *et al.*, 2007; Salvini *et al.*, 2009) e dalla configurazione spaziale degli individui stessi all'interno dell'area di campionamento (Curtu *et al.* 2007, Gugerli *et al.* 2007, Valbuena-Carabana *et al.*, 2007, Lepais 2008).

Sulla base di quanto riportato in letteratura, meccanismi simili potrebbero basso spiegare i livelli e i pattern di ibridazione osservati nell'area di Monte Vairano. E' stato inoltre evidenziato che, individui ibridi di *Q. petraea* e *Q. pubescens* sono stati rinvenuti anche in quegli stand dove sono assenti gli individui puri dell'una o dell'altra specie (stand MV01, MV03, MV06, MV08 e MV09). Un risultato del genere può essere collegato alla dispersione su brevi e medie distanze sia dei semi e sia dei pollini.

I risultati della caratterizzazione genetica dell'area simpatica di Monte Vairano sembrano inoltre evidenziare il legame ecologico tra tipologia di substrato litologico dei siti e tipologia e densità delle specie presenti. Confrontando la composizione genotipica degli stand con le tipologie di substrato rilevate, appare evidente il legame ecologico tra substrato e specie: un esempio è dato dalla popolazione MV08, che è composta quasi esclusivamente da individui puri di *Q. pubescens* e da una bassissima percentuale di ibridi *Q. petraea* × *Q. pubescens*. Infatti, querceti a roverella (*Quercus pubescens*) hanno carattere tipicamente termo-xerofilo e si sviluppano su substrati principalmente calcarei e calcareo-marnoso (Pignatti, 1982). Lo stesso risultato è emerso per le sette popolazioni campionate in Lazio su substrato calcareo:

tutte e tre hanno mostrato valori percentuali elevati di appartenenza ad individui puri di *Q. pubescens*. A sostegno di tale legame, l'analisi bayesiana applicata alle popolazioni di Monte Vairano ha inoltre evidenziato che gli stand di campionamento caratterizzati da substrati silicei ed esposizioni settentrionali presentano una netta dominanza di *Q. petraea* (MV01, MV03, MV06 e MV09), specie legata principalmente a condizioni microclimatiche fresche. Il flusso genico fra le tre specie risulta, così, influenzato da più fattori, come l'incrocio casuale, l'abbondanza delle specie negli stand e i fattori ambientali. E' stata inoltre evidenziata la presenza di una parziale barriera riproduttiva tra *Q. petraea*/*Q. pubescens* e *Q. frainetto*. Il diagramma in fig. 6.2 sintetizza il flusso genico evidenziato tra le tre specie nell'area campione: le frecce e il loro spessore simboleggiano il flusso interspecifico



riscontrato.

Fig. 6.2: Diagramma che sintetizza il flusso genico ed il grado di ibridazione rilevato nelle tre specie simpatiche indagate. Le frecce indicano la presenza di gene flow fra le specie con il relativo grado di ibridazione.

L'identificazione di barriere genetiche, più o meno accentuate, che influenzano i processi riproduttivi delle specie, è fondamentale per comprendere i meccanismi di mantenimento delle specie nei confronti di fattori come il flusso genico e la formazione di ibridi. In particolare, un contributo fondamentale è svolto dalla presenza di barriere prezigotiche (incompatibilità gametica, presenza di polline conspecifico) e postzigotiche (tasso di germinazione e di sopravvivenza) (Lepais *et al.*, 2012). Nel genere *Quercus* l'isolamento riproduttivo è principalmente legato alla presenza di barriere prezigotiche (Abadie *et al.* 2012, Lagache *et al.*, 2013), mentre hanno un effetto trascurabile quelle post-zigotiche, ciò a causa di alcune caratteristiche biologiche del gruppo (Lepais *et al.*, 2012). Le motivazioni sono diverse: in primo luogo, le querce hanno un'impollinazione anemofila, un meccanismo passivo che favorisce il movimento indiscriminato del polline nell'ambiente. Rispetto all'impollinazione entomogama, mediata quindi da insetti coinvolti direttamente nella scelta



di fiori, questo tipo d'impollinazione può essere considerato un fattore importante nell'isolamento riproduttivo delle specie (Lowry *et al.*, 2008, Hopkins & Rausher, 2012). In secondo luogo, molte specie del gruppo *Quercus* hanno una sovrapposizione temporale dei tempi di fioritura, ad eccezione di alcune di loro - *Q.frainetto*, *Q.pyrenaica* (Curtu *et al.*, 2007; Lepais *et al.*, 2012) e, infine, la distribuzione delle specie dipende strettamente dalle caratteristiche del suolo che può variare anche a piccola scala. Questi fattori spiegano il fatto che gli individui possano ricevere o meno contributi in termini di polline eterospecifico: ciò incide sull'isolamento stesso delle specie influenzando la formazione degli ibridi a causa della selezione da barriere prezigotiche (Lepais *et al.*, 2012). Studi precedenti hanno mostrato che in alcune specie del gruppo *Quercus*, queste barriere possono essere la causa di un totale isolamento riproduttivo. In Lepais *et al.* 2012 viene evidenziato che, *Q.robur* è isolata riproduttivamente da *Q.petraea* e *Q.pubescens* a causa di barriere prezigotiche come l'incompatibilità gametica verso il polline eterospecifico da parte di *Q.petraea* nei confronti di *Q.robur*. Nella stessa ricerca viene evidenziato che, come evidenziato anche in questo studio, *Q.pubescens*, mostra una elevata affinità nei confronti di *Q.petraea*, anche in presenza di polline conspecifico. Negli incroci tra *Q.petraea* e *Q.pubescens* non c'è quindi isolamento riproduttivo e ciò è indice di una maggiore tendenza al flusso genico tra queste due specie. La presenza di polline conspecifico può quindi ridurre la formazione di ibridi, ma non ne previene totalmente la formazione e ciò può dipendere da parametri sia ecologici che ambientali. In particolare l'abbondanza di specie locali potrebbe essere un fattore chiave nei meccanismi di flusso genico interspecifico tra popolazioni naturali (Lepais *et al.*, 2012). La compatibilità interspecifica in queste due specie dipende anche da particolari condizioni ambientali, come il substrato ricco di calcio (Ruane & Donohue, 2007-2008) o il contesto geografico (Aldridge & Campbell, 2006) che possono avere un notevole impatto sul successo dell'impollinazione interspecifica. Uno studio effettuato in Italia ha evidenziato che la compatibilità interspecifica, dovuta all'abbondanza degli individui *Q.petraea* e *Q.pubescens* può variare considerevolmente in termini di direzione interspecifica tra le due specie mostrando un maggiore successo di impollinazione da *Q.petraea* verso *Q.pubescens* piuttosto che da *Q.pubescens* verso *Q.petraea* (Salvini *et al.*, 2009). Recenti studi hanno evidenziato che il flusso genico interspecifico nel genere *Quercus* è molto comune ma, spesso, le forme ibride sono maggiormente localizzate in ecosistemi al margine delle rispettive nicchie ecologiche delle specie parentali (Lind and Gailing, 2013) ciò supporta l'idea che le querce non sono riproduttivamente isolate ma lo scambio di geni può produrre differenti pattern di

ibridazione ed avere importanti conseguenze evolutive.

Dai risultati ottenuti con l'analisi Bayesiana sulla variabilità genetica complessiva in *Quercus pubescens* è risultata evidente la presenza di una ben distinta struttura genetica nel complesso dei campioni analizzati e che gli individui appartenenti a *Q. pubescens* sono risultati geneticamente omogenei (cluster colore blu, fig. 5.2 B e 5.7), pur provenendo da siti molto distanti tra loro (da poche centinaia di metri fino a circa 500 km- fig. 5.3). In base a questi risultati sono stati analizzati i dati ottenuti dalla genotipizzazione dei soli individui puri di *Q. pubescens* (provenienza: Lazio, Molise e Puglia) al fine di analizzare la variabilità interspecifica di questo gruppo. Le analisi biostatistiche confermano e sostengono che non vi è una rilevabile differenziazione all'interno del genotipo di *Q. pubescens*.

Infatti, dall'analisi delle componenti principali (PCA) effettuata sulla matrice di distanza di Nei (1987) non emerge alcuna separazione all'interno del gruppo, rivelando una sovrapposizione dei cluster all'interno dell'unica specie parentale (fig. 5.8). Ciò è stato ulteriormente confermato dalla Cluster Analysis.

Dal dendrogramma ottenuto per gli stand campionati nella regione Puglia, si evidenzia ancora che all'interno del gruppo di *Q. pubescens* non si distinguono altri genotipi, identificabili con specie o sottospecie. Pur raggruppandosi in due cluster principali, i risultati dell'UPGMA presentano bassissimi valori di bootstrap ai nodi (fig. 5.11), tali da non poter identificare alcuna differenziazione tra i popolamenti campionati. Questi risultati, basati sull'utilizzo del set di 12 SSR, non supportano l'ipotesi che *Q. pubescens* possa essere distinta in altre specie. Un recente studio (Enescu *et al.*, 2013), basato sia su analisi morfologiche che molecolari, su individui di *Q. pubescens* e *Q. virgiliana*, rivela che l'elevata variabilità morfologica riscontrata fa solo supporre una differenziazione tra i due gruppi, mentre i risultati della genotipizzazione con 7 SSR, non evidenziano alcuna separazione tra i due taxa. A tal proposito, l'autore sottolinea che l'uso di macrodescrittori fogliari non evidenzia la distinzione tra le due specie a causa dell'elevata presenza di forme morfologiche intermedie tra i due taxa, inoltre i valori elevati di diversità genetica riscontrati in *Q. pubescens* rispetto a *Q. virgiliana* sono legati al basso numero di campioni di *Q. virgiliana* sottoposto a caratterizzazione molecolare. Dallo studio si evidenzia che l'assegnamento genetico dei campioni con metodi bayesiani, rivela un unico cluster genetico a cui sono riconducibili entrambi i taxa. Anche dai risultati ottenuti dalla presente ricerca emerge l'assegnazione genetica dei campioni di *Q. pubescens* ad un unico cluster, ma, in questo caso, non emergono informazioni che suggeriscono che nel gruppo ci siano campioni che possano essere

contraddistinti come appartenenti a ulteriori sub-unità tassonomiche di *Q. pubescens*.

Analizzando i risultati dell'analisi delle frequenze alleliche, è stato evidenziato che la popolazione di *Q. pubescens* che mostra i più alti valori di diversità genetica è quella campionata nell'area simpatica di Monte Vairano; seguita dai campioni delle stazioni laziali, e, in ultimo, dai campioni delle stazioni pugliesi. Solo la metà di questi ultimi presenta valori di diversità genetica sensibilmente sopra la media riscontrata in tutto il dataset. Lo stesso risultato è stato evidenziato per i valori medi dell'eterozigosità osservata ed attesa e la media degli indici di fissazione è risulta bassa nelle diverse aree indagate con valori sensibilmente più bassi nelle aree del Lazio e del Molise. I valori di eterozigosità attesa ( $H_e$ ) di tutte le popolazioni di *Q. pubescens* si mantengono in un range compreso tra 0.553 e 0.729 mentre i valori di eterozigosità osservata ( $H_o$ ) si mantengono invece in un range compreso tra 0.483 e 0.714 con una media del numero di alleli per locus pari a 6.54. Questi livelli di variabilità genetica possono considerarsi, nel complesso, in linea con quelli riportati per *Q. pubescens* da altri autori, tenendo conto della variabilità dei loci microsatellite indagati e della tipologia di campionamento. Ad esempio, in Curtu *et al.* (2006), in uno studio sulla variabilità genetica di *Q. pubescens*, effettuata su 6 loci microsatelliti in 73 individui (provenienza: Carpazi), viene riportato un valore medio di  $H_e$  pari a 0.891 ed un valore medio di alleli per locus di 19.7. Inoltre, in questo caso sono stati riscontrati 1.8 alleli privati, una ricchezza allelica di 17.8 ed un  $F = 0.001$ . In un successivo lavoro di Curtu *et al.* (2011), viene indagata la variabilità genetica di 65 individui di *Q. pubescens* mediante 7 loci microsatelliti (di cui 5 gSSR e 2 estSSR); in questo caso, il valore medio di alleli per locus è 17,  $H_e$  è pari a 0.859, la ricchezza allelica è 16.5 ed è stato riscontrato un  $F_{IS} = 0.067$ . In Enescu *et al.* (2013), in uno studio di variabilità a 7 loci microsatelliti in 96 campioni di *Q. pubescens* provenienti da tutta la Romania, vengono riportati valori medi di  $H_e$  pari a 0.847 e di  $H_o$  di 0.802. Quest'ultimo studio è stato eseguito utilizzando un set di microsatelliti altamente polimorfici, con un numero medio di 22 alleli per locus (da 14 a 40 alleli), superiore a quello registrato per il nostro dataset (tab. 5.4).

Per quanto riguarda il presente studio, gli stand pugliesi presentano valori più bassi in tutti i più importanti indici di variabilità genetica e i valori più bassi di differenziazione genetica sono stati riscontrati nell'area delle Murge e quella del Salento, dove le popolazioni di *Q. pubescens* sono maggiormente isolate da altre popolazioni della stessa specie e mostrano così una maggiore uniformità al loro interno.

A incidere sui questi risultati è sicuramente il contesto vegetazionale che caratterizza la

penisola pugliese. Alcune aree della regione risultano caratterizzate da situazioni particolarmente degradate, a causa dell'intenso sfruttamento per ceduazione e pascolamento. In particolare, in Salento, la forma di vegetazione predominante è rappresentata dai coltivi e da forme spontanee caratterizzate soprattutto da formazioni tipo macchia e gariga che rappresentano aspetti degradati di antiche cenosi forestali (Biondi *et al.*, 2010). Qui sopravvivono pochi, ma importanti, nuclei di macchia mediterranea con formazioni a *Quercus calliprinos* e *Quercus coccifera* associata a *Quercus pubescens* (Biondi *et al.*, 2010). Anche l'area delle Murge è caratterizzata da boschi ridotti e degradati a dominanza di *Quercus dalechampii*, con *Q. virgiliana* e *Q. pubescens* (Biondi *et al.*, 2010) e, più a sud, si rinvenivano boschi a quercia da sughero mentre *Quercus virgiliana* è stata segnalata in aree con substrato profondo caratterizzate dalla presenza di leccete.

Al contrario, in Molise e in Lazio la roverella è una specie comune in tutto il territorio dove forma boschi puri, oppure si associa a cerro, farnetto e rovere in condizioni di mesofilia, tali da rendere possibile un maggior flusso genico e di diversità genetica nel gruppo.

I livelli di polimorfismo molecolare riscontrati in questo studio per *Q. pubescens* trovano riscontro con la letteratura generale (Bellarosa *et al.*, 2004, Enescu *et al.* 2013; Curtu *et al.*, 2011, Fortini *et al.* 2007, 2009; Neophytou *et al.* 2013; Petit *et al.* 2003b; Viscosi *et al.* 2009) ma, il confronto fra i risultati ottenuti, va comunque fatto con cautela dal momento che vanno considerate le differenze nelle strategie di campionamento, la scala geografica considerata e la tipologia di marcatori impiegati.

Il livello relativamente basso di diversità intraspecifica in *Q. pubescens* evidenziato in Puglia potrebbe essere legato alla tipologia di campionamento adottato, come pure alla localizzazione geografica stessa, che rappresenta il limite meridionale della specie in Italia. Infatti, bassi livelli di diversità intraspecifica, spiegati come conseguenza di gravi periodi di siccità a seguito dell'Olocene, sono stati riscontrati anche altre popolazioni marginali del gruppo *Quercus* (*Quercus suber*, Magri 1997 e Jiménez *et al.* 1999 in Conte *et al.* 2007).

Ad esempio, uno studio su popolazioni periferiche dell'areale settentrionale di *Q. pubescens* mostra come questa specie sia in grado di mantenere l'isolamento riproduttivo rispetto ad altre specie simpatriche e interfertili presenti nell'area (Chybicki *et al.*, 2012). In questo caso, caratteri morfologici intermedi tra la roverella e la farnia facevano presupporre l'ipotesi dell'introgresione tra le due specie, ma i risultati hanno mostrato che la popolazione di *Q. pubescens* è risultata geneticamente distinta sia dalla farnia che dalla rovere. Inoltre, questi popolamenti di *Q. pubescens* hanno rivelato una bassa variabilità genetica suggerendo un

isolamento riproduttivo legato alla limitata disponibilità di polline conspecifico.

L'elevato livello di variabilità genetica osservata nell'intero campione di *Q. pubescens* può essere spiegata con la maggiore propensione di questa specie a ibridarsi con altre specie congeneriche (Curtu *et al.*, 2011); questo risultato appare evidente sia se si considerano i risultati relativi al flusso genico evidenziato con *Q. petraea* nel presente studio, che i risultati di altre ricerche effettuate nei diversi areali di distribuzione (Curtu *et al.*, 2007b, Lepais *et al.*, 2009, Salvini *et al.*, 2009, Lepais e Gerber 2010). L'elevata diversità e il maggior flusso genico riscontrato tra *Q. petraea* e *Q. pubescens* si spiegano con il loro ampio range di distribuzione: in tutta l'area del Mediterraneo sono infatti le due querce bianche più abbondanti (Salvini *et al.*, 2009); inoltre queste due specie sono strettamente correlate filogeneticamente a causa della loro forte coesistenza nella zona durante l'Oligocene (Bellarosa *et al.*, 2005, Papini *et al.*, 2011).

Concludendo, questo lavoro contribuisce sostanzialmente nell'ambito delle ricerche sul flusso genico nel genere *Quercus* e sui problemi di inquadramento tassonomico di *Q. pubescens*. Inoltre fornisce nuove informazioni in merito ad alcuni aspetti specifici dell'interfertilità interspecifica e apporta ulteriori conoscenze a specie meno studiate in Europa, come *Q. frainetto*. Dai risultati fin qui esposti, è stato realizzato un articolo scientifico (attualmente in revisione) sull'analisi della variabilità genetica a livello inter- e intra-specifica nel popolamento misto di Monte Vairano (Molise). Questi risultati sono stati anche oggetto di articoli pubblicati su riviste scientifiche internazionali (Viscosi *et al.*, 2012; Fortini *et al.*, 2013), come integrazione alle analisi di differenziazione inter-specifica su base morfologico-fogliare.

Infine, dalla presente ricerca emerge come il flusso genico nel genere *Quercus* sia strettamente correlato a fattori come l'ecologia, la fisiologia, l'abbondanza delle specie e a eventuali barriere riproduttive tra le specie, offrendo una ulteriore comprensione della biologia e dell'evoluzione di questi taxa nella penisola italiana.

## Bibliografia

- Abadie P., Roussel G., Dencausse B., Bonnet C., Bertocchi E., Louvet J.M., Kremer A. and Garnier-Géré P., 2012 - Strength, diversity and plasticity of postmating reproductive barriers between two hybridizing oak species (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt) Liebl.). *Journal of Evolutionary Biology*, 25: 157–173. doi: 10.1111/j.1420-9101.2011.02414.x
- Abdelkrim J., Robertson B., Stanton J.A., Gemmell N., 2009 - Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques*, 46, 185-192.
- Allard R.W., 1970 - Population structure and sampling methods. In: O.H. Frankel, E. Bennett. *Genetic Resources in Plants. Their Exploration and Conservation*. IBP Handbook n. 11, Blackwell, Oxford and Edinburgh, pp. 97-107.
- Allendorf F.W., Luikart G., 2007 - *Conservation and the genetics of populations*. Blackwell Publishing, Carlton.
- Amos W., Hoffman J.I., Frodsham A., Zhang L., Best S. and Hill A.V. S., 2007 - Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes*, 10-14.
- Anderson E. and Stebbins J., 1954 - Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution* 8, 378-388.
- Arcangeli G., 1894 - *Flora Italiana*: 180 - 181. Loescher, Torino e Roma.
- Axelrod D.J., - 1983 - Biogeography of oaks in the Arcto-Tertiary Province. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 70, pp 629-657.
- Bacilieri R., Roussel G. and Ducousso A., 1993 - -Hybridization and mating system in a mixed stand of sessile and pedunculate oak. *Ann. Sci. For.* 50: 122-127.
- Bacilieri R., Labbé T. and Kremer A., 1994 - -Intraspecific genetic structure in a mixed population of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. *Heredity* 73: 130-141.
- Barrett S.C.H., Kohn J.R., 1991 - Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: D.A. Falk, K.E. Holsinger (Eds.). *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York, pp. 3-30.
- Barret C., Lefort F., Douglas G.C., 1997 - -Genetic characterisation of oak seedlings, epicormic, crown and micropagated shoots from mature trees by RAPD and microsatellitare PCR. *Scientia Horticulturae* 70: 319-330.
- Barreneche T., Bodenes C., Lexer C., Trontin J.F., Fluch S., Streiff R., Plomion C., Roussel G., Steinkellner H., Burg K., Favre J.M., Glössl J. and Kremer A., 1998 - -A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 7: 1090-1103.
- Barreneche T., Casasoli M., Russell K., Akkak A., Meddour H., Plomion C., Villani F. And Kremer A., 2004 - Comparative mapping between *Quercus* and *Castanea* using simple-sequence repeats (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics* 108, 558-566.
- Bellarosa R., Simeone M.C., Papini A., Schirone B., 2005 - -Utility of ITS sequence data for phylogenetic reconstruction of Italian *Quercus* spp. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 355-370.
- Belletti P. and Leonardi S., 1997 - -Variabilità genetica in popolazioni piemontesi di quercia. *Atti Convegno “La ricerca italiana per le foreste e la selvicoltura”*, Legnaro, 4-6 giugno 1997: pp. 155-160.

- Bertoloni A., 1854 - -Flora Italica. 10: 205 - 222. *Typographaeo Haeredum Richardii Masii. Bononiae.*
- Beurton P.J., 2002 - Ernst Mayr through time on the biological species concept - a conceptual analysis. *Theory in Biosciences* 121, 81-98.
- Biondi C., Casavecchia S., Beccarisi L., Marchiori S., Medagli P., Zuccarello V., 2010 - "Le serie di Vegetazione della regione Puglia". In: Blasi C. (ed.), *La vegetazione d'Italia* - Palombi Editori. Roma.
- Blasi C., Di Pietro R., Filibeck G., Filesi L., Ercole S., Rosati L., 2010 - -Le serie di Vegetazione della regione Lazio. In: Blasi C. (ed.), *La vegetazione d'Italia* - Palombi Editori. Roma.
- Boccacci P., Akkak A., Marinoni D.T., Bounous G., Botta R., 2004 - Typing European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars using oak simple sequence repeat markers. *Hortscience* 39, 1212-1216.
- Bodénès C., Labbé T., Pradère S. and Kremer A., 1997 - General vs. local differentiation between two closely related white oak species. *Molecular Ecology* (6): 713.
- Bones T. J., 1979 - Atlas of fossil fruits and seeds from north central Oregon Mus. Sci. Industr. Occas. Pap. Nat. Sci. 1: 1-23
- Borzi A., 1880 - *Flora Forestale Italiana*: 145 - 176. Tipografia dell'Arte e della Stampa, Firenze.
- Borzi A., 1905 - Note critiche sulle querce italiane. *Boll. Reale Orto Bot. Giard. Col. Palermo*. 4(1): 40-49.
- Borzi A., 1911 - Le querce della flora italiana. *Boll. Reale Orto Bot. Giard. Col. Palermo*. 14(1): 41-66.
- Barodzich M., 2009 - Tesi di laurea - Differenziamento genetico in *Chaenoccephalus aceratus* nell'intero range di distribuzione. Università degli Studi di Padova, a.a. 2008-2009.
- Brewer S., Cheddadi R., Beaulieu J.L., Reille M., 2002 - The spread of deciduous *Quercus* throughout Europe since the last glacial period. *Forest Ecology and Management* 156, pp 27-48.
- Bruford M.W., Wayne R.K., 1993 - Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development* 3: 939-943.
- Brullo S., Guarini R. & Siracusa G., 1999 - Revisione tassonomica delle querce caducifoglie della Sicilia. *Webbia* 54 (1): 1 - 72.
- Bruni I., 2010 - Il genere *Rhododendron* L.: diversità genetica e fenomeni di ibridazione. Tesi di dottorato.
- Bruschi P., Vendramin G.G., Bussotti F.; Grossoni P., 2000 - Morphological and molecular differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) and *Quercus pubescens* Willd. (Fagaceae) in northern and central Italy. *Annals of Botany* 85: 325 - 333.
- Bruschi P., Vendramin G. G., Bussotti F. e Grossoni P., 2003 - Morphological and molecular diversity among Italian populations of *Quercus petraea* (Fagaceae). *Annals of Botany* 91, pp 707-716.
- Buck G.W. and Bidlack J.E., 1998 - Identification of *Quercus* and *Celtis* species using morphological and elettrophoretic data. *Proc. Okla. Acad. Sci.*, 78: 23-33.
- Burger W.C., 1975 - The Species Concept in *Quercus*. *Taxon*, Vol. 24, No. 1, 45-50.
- Bussotti F. and Grossoni P., 1997 - European and Mediterranean oaks (*Quercus* L.; *Fagaceae*): SEM characterization of the micromorphology of the abaxial leaf surface. *Botanical Journal of le Linnean society*, 124: 183-199.
- Bussotti F. e Grossoni P., 1997 - Querce Europee e mediterranee: problemi tassonomici. *L'Italia Forestale e Montana*. Anno LII, fasc. n. 4:240-260.
- Camus A., 1936-54 - Le Chênes: Monographie du genere *Quercus*. Vol. I - III. Edit. P. Lechevalier, Paris.

- Campbell N.A., 2002 - Principi di biologia. Zanichelli editore. Ristampa 5.
- Chybicki I.J., Oleksa A., Kowalkowska K. and Burczyk J., 2012 - Genetic evidence of reproductive isolation in a remote enclave of *Quercus pubescens* in presence of cross-fertile species. *Plant Systematics and Evolution* 298:1045-1056
- Cooperrider M., 1957 - Introgressive hybridization between *Quercus marilandica* and *Q. velutina* in Iowa. *Amer. Jour. Bot.* 44: 804-810.
- Corti R., 1955 - Le querce italiane. *Monti e Boschi* (11/12): 511-513.
- Coyne J. A., Orr H. A. and Futuyma D. J., 1988 - Do we need a new species concept? *Systematic Zoology* 37: 190-200.
- Curtu A., Finkeldey R. and Gailing O., 2004 - Comparative sequencing of a microsatellite locus reveals size homoplasy within and between European oak species (*Quercus* spp.). *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 339-346.
- Curtu A. L., Gailing O., Leinemann L. and Finkeldey R., 2006 - Genetic variation and differentiation within a natural community of five oak species (*Quercus* spp.). *Plant Biology* 9 (2007): 116-126.
- Curtu A., Gailing O. and Finkeldey R., 2007- Evidence for hybridization and introgression within a species-rich oak (*Quercus* spp.) community *BMC Evolutionary Biology*, 7:218.
- Degen B., Streiff R. and Ziegenhagen B., 1999 - Comparative study of genetic variation and differentiation of two pedunculate oak (*Quercus robur*) stands using microsatellite and allozyme loci. *Heredity* 83,597-603.
- Deguilloux M.F., Pemonge M.H., Bertel L., Kremer A. and Petit R.J., 2003 - Checking the geographical origin of oak wood: molecular and statistical tools. *Molecular Ecology* 12: 1629-1636.
- Dewoody J., Nason J.D. and Hipkins V.D., 2006 - Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. *Mol. Ecol. Notes*. 6:951-957.
- D'Imperio M., Viscosi V., Scarano M.T., D'Andrea M., Zullo B.A., Pilla F., 2011 - Integration between molecular and morphological markers for the exploitation of olive germoplasm (*Olea europaea*) *Scientia Horticulturae* 130 (1), 229-240.
- Di Pietro R., Dibitonto P., Garziano G., Sciandrello S., Wagensommer R.P., Medagli P. and Tomaselli V., 2009 - Preliminary results of floristic and vegetation surveys in three coastal humid areas in the Puglia region (Southern Italy). *Lazaroa* 30: 99-107.
- Di Pietro R., Viscosi V., Peruzzi L., Fortini P., (2012). A review of the application of the name *Quercus dalechampii*. *Taxon* 61:1311- 1316.
- Dynesius M., Jansson R., 2000 - Evolutionary consequences of changes in species' geographical distribution driven by Milankovitch climate oscillations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 9115-9120
- Dow B. D., and Ashley M.V., 1996 - Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Mol. Ecol.* 5: 120-130.
- Duminil J., Kenfack D., Viscosi V., Grumiau L., Hardy O.J., 2012 - Testing species delimitation in sympatric species complexes: the case of an African tropical tree, *Carapa* spp. (*Meliaceae*) *Molecular phylogenetics and evolution* 62 (1), 275-285.
- Dumolin-Lapégue S., Gielly L., Ggrivet D. and Petit R. J., 2003 - A set of primers for the amplification of chloroplast microsatellites in *Quercus*. *Molecular Ecology Notes*.
- Fernandez J.F., Sork V.L., Gallego G., Lopez J., Bohorques A. and Tohme J., 2000 - Cross-amplification of microsatellite loci in a neotropical *Quercus* species and standardization of DNA extraction from mature leaves dried in silica gel. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 397a-397e.
- Fineschi S., Vendramin G.G. and Petit R.J., 1999 - Distribuzione della diversità genetica nei genomi cloroplastico e mitocondriale in piante forestali. II Congresso Nazionale SISEF: "Applicazioni e prospettive per la ricerca forestale Italiana". *Atti* 2: 225-228.



- Fineschi S., Turchini D., Grossoni P., Remy J. P., Vendramin G.G., 2002 - Chloroplast DNA variation of white oaks in Italy. *Forest Ecology and Management*, 156: 103-114.
- Fineschi S., Vendramin G.G., 2004 - La diversità cloroplastica delle querce italiane: evidenze di una maggiore ricchezza genetica nelle popolazioni meridionali e insulari. *Forest@* 1 (2): 82-87.
- Fiori A., 1923 - Nuova Flora Analitica d'Italia. 1: 361 - 367. Tipografia M. Ricci, Firenze.
- Fiori A., 1930b - Di alcune varietà e degli ibridi e meticci di *Quercus robur*. *L'alpe*, 17, 365-366.
- Fisher R. A., 1935 - The logic of inductive inference. *Journal of the Royal Statistical Society*. 98:39-82.
- Fortini P., Viscosi V., Maiuro L., Fineschi S. e Vendramin G.G., 2009 - Comparative leaf surface morphology and molecular data off five oaks of the subgenus *Quercus* Oerst (*Fagaceae*). *Plant Biosystems*, 143, n.3: 543-554.
- Fortini P., Antonecchia G., Di Marzio P., Maiuro L., Viscosi V., 2013 - Role of micromorphological leaf traits and molecular data in taxonomy of three sympatric white oak species and their hybrids (*Quercus* L. ). *Plant Biosystems*, DOI: 10.1080/11263504.2013.868374
- Frodin DG. 2004. History and concepts of big plant genera. *Taxon* 53 (3): 753-766.
- Gellini R. & Grossoni P., 1997 - Botanica Forestale. 2: 92 - 162. CEDAM, Milano.
- Gellini R., Bussotti F., Bettini D., Grossoni P., Bottacci F., 1992 - Species of the genus *Quercus* in Italy: characterization by means of leaf surface observation. *Giornale Botanico Italiano* 126: 481-504.
- Glaubitz J.C. and Moran G.F., 2000 - Genetic tools: The use of biochemical and molecular markers. Ch 4 in A. Young, D. Boshier and T. Boyle (eds), *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*, CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Gonzalez-Rodriguez A., Bain J.F., Golden J.L. and Oyama K., 2004a - Chloroplast DNA variation in the *Quercus affinis*-*Q. laurina* complex in Mexico: geographical structure and associations with nuclear and morphological variation. *Molecular Ecology* 13: 3467-3476.
- González-Rodríguez, Arias D.M., Oyama K., 2004b - Morphological and RAPD analysis of hybridization between *Quercus affinis* and *Q. laurina* (*Fagaceae*), two Mexican red oaks. *American Journal of Botany*.
- Gavrilets S., 2003 - Models of speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution* 57: 2197-2215.
- Gerard P.R., Klein E.K., Austerlitz F., Fernandez-Manjarres J.F. and Frascaria-Lacoste N., 2006 - Assortative mating and differential male mating success in an ash hybrid zone population. *Bmc Evolutionary Biology* 6.
- Grivet D., Deguilloux M.-F., Petit R.J. and Sork V.L., 2006. Contrasting patterns of historical colonization in white oaks (*Quercus spp.*) in California and Europe. *Mol. Ecol.* 15: 4085-4093
- Gugerli F. *et al.*, 2007 - Coincidence of small-scale spatial discontinuities in leaf morphology and nuclear microsatellite variation of *Quercus petraea* and *Q. robur* in a mixed forest. *Annals of Botany* 99: 713-722.
- Guichoux E., Garnier-Géré P., Lagache L., Lang T., Boury C., Petit R.J., 2013 - Outlier loci highlight the direction of introgression in oaks. *Molecular Ecology* 22:450-462.
- Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Chaumeil P., Léger P., Lepais O., Lepoittevin C., Malausa T., Revardel E., Salin F., Petit R.J., 2011a - Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* 11: 591-611.
- Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Léger P. and Petit R.J. 2011b - Two highly validated multiplexes (12-plex and 8-plex) for species delimitation and parentage analysis in oaks

- (*Quercus spp.*). Molecular Ecology Resources 11: 578-585.
- Hardy O.J., 2003 - Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation-by-distance processes using dominant genetic markers. Molecular Ecology 12, 1577-1588.
- Harris S.A. and Ingram R., 1991 - Chloroplast DNA and biosystematics: the effect of intraspecific diversity and plastid transmission. Taxon 40: 393-412.
- Harrison R.G., 1993 - Hybrid zones and the evolutionary process Oxford University Press, New York, USA.
- Hayden M.J., Nguyen T.M., Waterman A. and Chalmers K.J., 2008 - Multiplexready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. BMC Genomics, 9, 80.
- Hill C.R., Butler J.M., Vallone P.M., 2009 - A 26plex autosomal STR assay to aid human identity testing. Journal of Forensic Sciences, 54, 1008-1015.
- Holley C.E., Geerts P.G., 2009 - Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. BioTechniques, 46, 511-517.
- Jiang Z. P., 1993 - Chinese oaks in the Tertiary. Acta. Botanica Sinica 35 (5): 397-408
- Jarne P., Lagoda P.J.L., 1996 - Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends in Ecology and Evolution 11: 424-429.
- Jensen, R. J. and Eshbaugh W. H., 1976a - Numerical taxonomic studies of hybridization in *Quercus*. I. Populations of restricted areal distribution and low taxonomic diversity. Syst. Bot. 1: 1-9.
- Jensen J.S., Olrik D.C., Siegismund H.R., Lowe A.J., 2003 - Population genetics and spatial autocorrelation in an unmanaged stand of *Quercus petraea* in Denmark. Scandinavian Journal of Forest Research 18, 295-304.
- Karp A., Kresovich S., Bhat K.V., Ayand W.G., Hodgkin T., 1997 - Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin No. 2, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Kampfer S., Lexer C., Glossl J. and Steinkellner H., 1998 - Characterization of (GA), microsatellite loci from *Quercus robur*. Hereditas 129: 183-186.
- Kawalko A, Dufkova P, Wojcik JM, Pialek J (2009) Polymerase chain reaction multiplexing of microsatellites and single nucleotide polymorphism markers for quantitative trait loci mapping of wild house mice. Molecular Ecology Resources, 9, 140-143.
- Kay K.M., 2006 - Reproductive isolation between two closely related hummingbird-pollinated neotropical gingers. Evolution 60, 538-552.
- Kleinschmit J.R.G., Bacilieri R., Kremer A., Roloff A., 1995 - Comparison of morphological and genetic traits of pedunculate oak (*Q. robur* L.) and sessile oak (*Q. petraea* (Matt.) Liebl.). *Silvae Genetica* 44: 256-268.
- Kremer A., 2002 - Chloroplast DNA variation in European white oaks Phylogeography and pattern of diversity based on data from over 2600 populations. Forest Ecology and Management, 156: 5-26.
- Kremer A., Kleinschmit J., Cottrell J., Cundall E.P., Deans J.D., Ducousso A., Konig A.O., Lowe A.J., Munro R.C., Petit R.J., Stephan B.R., 2005 - Is there a correlation between chloroplastic and nuclear divergence, or what are the roles of history and selection on genetic diversity in European oaks? Forest Ecology and Management 156: 75-87.
- Kremer A., Le Corre V., Petit R.J., Ducousso A., 2010 - Historical and contemporary dynamics of adaptive differentiation in European oaks. In : DeWoody A, Bickham J, Michler C, Nichols K, Rhodes G, Woeste K (eds), p101-122 Molecular approaches in natural resource Conservation . Cambridge University Press.
- Kvaček, Z., Walther, H., 1989 - Paleobotanical studies in *Fagaceae* of the European Tertiary. Pl. Syst. Evol. 162: 213-229.
- Lagache L., Klein E.K., Guichoux E., Petit R.J., 2013 - Fine-scale environmental control of

- hybridization in oaks. *Mol Ecol.* 2013 Jan;22(2):423-36. doi: 10.1111/mec.12121. Epub 2012 Nov 22.
- Law J.R., Donini P., Koebner R.M.D., Jones C.R., Cooke R.J., 1998 - DNA profiling and plant variety registration III: The statistical assessment of distinctness in wheat using amplified fragment length polymorphisms. *Euphytica* 102: 335-342.
- Lepais O., Russel G., Hubert F., Kremer A., Gerber S., 2012 - Strength and variability of postmating reproductive isolating barriers between four European white oak species. *Tree Genetics & Genomes* 9 (3), 841-853.
- Lepais O., 2008 - Tesi di dottorato - Dynamique d'hybridation dans le complexe d'espèces des chênes blancs européens. Université Bordeaux (France).
- Lepais O., Petit J., Guichoux E., Lavabre E., Alberto F., Kremer A. and Gerber S., 2009 - Species relative abundance and direction of introgression in oaks. *Molecular Ecology*, 18, 2228-2242.
- Lexer C., Kremer A. & Petit R.J., 2006 - Shared alleles in sympatric oaks: recurrent gene flow is a more parsimonious explanation than ancestral polymorphism. *Molecular Ecology* 15, 2007-2012.
- Lopez de Heredia U., Jimenez P., Diaz-Fernandez P. and Gil L., 2005 - The Balearic Islands: a reservoir of cpDNA genetic variation for evergreen oaks. *Journal of Biogeography (J. Biogeogr.)* 32: 939-949.
- Manchester S.R., 1994 - Fruits and seeds of the Middle Eocene Nut Beds flora, Clarno Formation, North Central Oregon. *Palaeontogr. Amer.* 58: 1-205.
- Manos P.S., Dojle J.J., Nixon K.C., 1999 - Phylogeny, biogeography and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (*Fagaceae*). *Mol. Phylogenet Evol.* 12: 333-349.
- Manos P.S., Stanford A.M., 2001 - The historical biogeography of *Fagaceae* : tracking the Tertiary history of temperate and subtropical forests of the northern hemisphere. *Int. J. Plant Sci.* 162 (6 Suppl.): s77-s93.
- Manos P.S., Zhou Z.K. and Cannon C.H., 2001 - Systematics of *Fagaceae*: phylogenetic test of reproductive trait evolution. *Int. J. Plant Sci.*, 162: 1361-1379.
- Mantel N., 1967 - The detection of disease clustering and a generalized regression. *Cancer Research* 27: 377-394.
- Mariette S., Cottrell J., Csaikl U.M., Goikoechea P., Konig A., Lowe A.J., Van Dam B.C., Barreneche T., Bodenes C., Streiff R., Burg K., Groppe K., Munro R.C., Tabbener H., Kremer A., 2002 - Comparison of levels of genetic diversity detected with AFLP and microsatellite markers within and among mixed *Q.petraea* (MATT.) LIEBL. and *Q.robur* L. stands. *Silvae Genetica* 51, 72-79.
- Martin N.H., Bouck A.C., Arnold M.L., 2007 - The genetic architecture of reproductive isolation in Louisiana irises: Flowering phenology. *Genetics* 175, 1803-1812.
- Martin N.H., Sapir Y., Arnold M.L., 2008 - The genetic architecture of reproductive isolation in Louisiana irises: pollination syndromes and pollinator preferences. *Evolution* 62, 740-752.
- Mátyás V., 1973 - The Italian pubescens oak (*Quercus virgiliana* Ten. 1836) in the Carpathian basin and its outer fringes. *Proceedings of the Hungarian Forest Research Institute. Vol.* 69(2): 47-91.
- Mayr E., 1942 - Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist. Columbia University Press, New York.
- Mayr E., 1963 - Animal species and evolution, Cambridge, Massachusetts.
- Morales R., Vicente J. A., Galan de Mera A., 2005 - cpDNA evidence of introgressions in *Quercus* L. (*Fagaceae*). The influence of the phytotopographic position. *Flora* 200: 222-228.

- Muir G., Schlotterer C., 2005 - Evidence for shared ancestral polymorphism rather than recurrent gene flow at microsatellite loci differentiating two hybridizing oaks (*Quercus spp.*). *Molecular Ecology*, 14: 549-561.
- Muller U.G., Wolfenbarger L.L., 1999 - AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*, 14, 389-394.
- Nixon K.C., 1993 - Infrageneric classification of *Quercus* (*Fagaceae*) and typification of sectional names. *Ann. Sci. For. Suppl. 1* (Paris) 50: 25-34.
- Paran I. & Michelmore R.W., 1993 - Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85:985-993.
- Paura B., Fortini P., Presti G., Stanisci A., Di Marzio P., Blasi C., 2010 - "Le serie di Vegetazione della regione Molise". In: Blasi C. (ed.), *La vegetazione d'Italia* - Palombi Editori. Roma.
- Pè M.E., 1992 - Nuove tecnologie e loro utilizzazione per la costruzione di mappe genetiche. In: *Metodologie innovative per l'analisi genetica*. Associazione Genetica Italiana, Società Italiana di Genetica Agraria eds. Cortina: 7-23.
- Peakall R., Smouse P., 2006 - Genalex6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, Volume 6, Number 1, pp. 288-295(8).
- Petit R.J., Wagner D.B., Kremer A., 1993 - Ribosomal DNA and chloroplast DNA polymorphism in a mixed stand of *Quercus robur* and *Q. petraea*. *Ann Sci For* 50: Suppl. 1, 41s-47s
- Petit R.J., Pineau E., Demesure B., Bacilieri R., Ducousso A., Kremer A., 1997 - Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proceedings Natural Academy of Science USA*, 94: 9996-10001
- Petit R.J. *et al.*, 2002a - Chloroplast DNA variation in European white oaks Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management*, 156: 5-26.
- Petit R.J. *et al.* 2002b - Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management*, 156: 49-74.
- Petit R.J., Latouche-Halle C., Pemonge M.H., Kremer A., 2002c - Chloroplast DNA variation of oaks in France and the influence of forest fragmentation on genetic diversity. *Forest Ecology and Management* 156: 115-129.
- Petit R.J., Bodénès C., Ducousso A., Roussel G. and Kremer A., 2003a - Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. *New Phytologist* 161: 151-164.
- Petit R.J. *et al.* 2003b - Glacial Refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science*, 300: 154-157.
- Petit R.J., Deguilloux M., Chat J., Grivet D., Garnier-Gèrè P. and Vendramin G.G., 2005b - Standardizing for microsatellite length in comparisons of genetic diversity. *Molecular Ecology*, 14: 885-890.
- Pignatti S., 1982 - *Flora d'Italia*. 1: 113 - 120. Edagricole, Bologna.
- Rattenbury J.A., 1962 - Cyclic hybridization as a survival mechanism in the New Zealand forest flora. *Evolution* 16, 348-363.
- Robinson J.P. and Harris S.A., 1999 - Amplified Fragment Length Polymorphisms and Microsatellites: A phylogenetic perspective. Chapter 12 in: *Which DNA Marker for Which Purpose? Final Compendium of the Research Project Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity*. Gillet, E.M. (ed.). 1999. URL <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>

- Roma-Marzio F. 2011 - Studio sulla distribuzione delle querce caducifoglie nel Salento (*Quercus amplifolia* Guss.; *Quercus dalechampii* Ten.; *Quercus frainetto* Ten.; *Quercus virgiliana* Ten.; *Quercus ithaburensis* subsp. *macrolepis* Kotschy). Tesi di laurea.
- Salvini D., Bruschi P., Fineschi S., Grossoni P., Kjær E. D. & Vendramin G. G., 2008 - Natural hybridisation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. within an Italian stand as revealed by microsatellite fingerprinting - Plant Biology ISSN 1435-8603.
- Samuel R., Bachmair A., Jobst J., Ehrendorfer F., 1998 - ITS sequences from nuclear rDNA suggest unexpected phylogenetic relationships between Euro-Mediterranean, East Asiatic and North American taxa of *Quercus* (Fagaceae). Plant Syst. Evol. 211, 129-139.
- Sánchez M.C., Martínez M.T., Valladares S., Ferro E., Viéitez A.M., 2003 - Maturation and germination of oak somatic embryos originated from leaf and stem explants: RAPD markers for genetic analysis of regenerants. J. Plant Physiol. 160. 699-707.
- Santana Q.C., Coetzee M.P.A., Steenkamp E.T. *et al.*, 2009 - Microsatellite discovery by deep sequencing of enriched genomic libraries. BioTechniques, 46, 217-223.
- Savolainen V., Anstett M.C., Lexer C., Hutton I., Clarkson J.J., Norup N.V., P. Powell M., Springate D., Salamin N. and Baker W.J., 2006 - Sympatric speciation in palms on an oceanic island, Nature 441, 210-213.
- Savulescu T., 1952 - *Flora Republicii Populare Romane*. 1: 224 - 260. Editura Academiei Republicii Populare Romane. Bucarest.
- Schwarz O., 1964 - *Quercus* L. In: Tutin *et al.* (Eds.), *Flora Europaea* 1: 61 - 64. Cambridge University.
- Schwarz O., 1993 - *Quercus* L. In: Tutin *et al.* (Eds.), *Flora Europaea* 1: 72 - 76. Ed. 2, Cambridge University.
- Scippa G.S., Trupiano D., Rocco M., Viscosi V., Di Michele M., D'Andrea A., 2008 - An integrated approach to the characterization of two autochthonous lentil (*Lens culinaris*) landraces of Molise (south-central Italy). Heredity 101 (2), 136-144.
- Song J., Nam-Sur K., Young-Joung K., Jae-Mo S., Jae-Seon Y., 2002 - Genetic variation of *Quercus variabilis* in Korea based on RAPD marker analysis. Korean Journal of Genetics.
- Steinhoff S., 1993 - Results of species hybridization with *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. Annales des Sciences Forestières, 50, 137-143.
- Steinkellner H., Fluch S., Turetschek E., Lexer C., Streiff R., Kremer A., Burg K. and Gl'ossel J., 1997 - Identification and characterization of (GA/CT)<sub>n</sub>- microsatellite loci from *Quercus petraea*. Plant Molecular Biology 33: 1093-1096.
- Streiff R., Labbe T., Bacilieri R., Steinkellner H., Gloss J. and Kremer A., 1998 - Within-population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. Molecular Ecology, 7: 317-328.
- Streiff R., Ducouso A., Lexer C., Steinkellner H., Gloessl J., Kremer A., 1999 - Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. Molecular Ecology 8, 831-841.
- Tenore M., 1826 - Osservazioni sulla Flora Virgiliana. pp.: 11-12. Tipografia Zambraja, Napoli.
- Toumi L., Lumaret R., 2001 - Allozyme characterisation of four Mediterranean evergreen oak species. Biochemical Systematics and Ecology 29: 799-817.
- Trelease W. 1924. The American oaks. Mem. Natl. Acad. Sci. 20: 1-255
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P., 2004 - MICRO CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol Ecol Notes 4: 535-538.

- Viscosi V., 2007 - Indagini tassonomiche su alcune specie del genere *Quercus* L. (subgen. *Quercus* Oerst.) in Italia centro-meridionale. Università degli Studi di Roma "La Sapienza". Tesi di dottorato, a.a. 2003-2004.
- Viscosi V., Fortini P., Slice D.E., Loy A., Blasi C., 2009 - Geometric morphometric analyses of leaf variation in four oak species of subgenus *Quercus* (*Fagaceae*). *Plant Biosystems*, 143, n.3: 575-587.
- Viscosi V., Lepais O., Gerber S., Fortini P., 2009 - Leaf morphological analyses in four European oak species (*Quercus*) and their hybrids: a comparison of traditional and geometric morphometric methods. *Plant Biosystems*, 143, n.3: 564-574.
- Viscosi V., Loy A., Fortini P., 2010 - Geometric morphometric analysis as a tool to explore covariation between shape and other quantitative leaf traits in European white oaks. EUT Edizioni Università di Trieste
- Viscosi V., Fortini P., 2011 - Leaf shape variation and differentiation in three sympatric white oak species revealed by elliptic Fourier analysis. *Nordic Journal of Botany* 29: 632-640.
- Viscosi V., Antonecchia G., Lepais O., Fortini P., Gerber S., Loy A., 2012 - Leaf shape and size differentiation in white oaks: assessment of allometric relationships among three sympatric species and their hybrids. *International Journal of Plant Sciences* 173: 875-884.
- Wagner W.H.J., 1970 - Biosystematics and evolutionary noise. *Taxon* 19, 146-151.
- Wang H., E. D. Mc Arthur, S.C. Sanderson, J.H. Graham and Freeman D.C., 1997 - Narrow hybrid zone between two subspecies of big sagebrush (*Artemisia tridentata*: *Asteraceae*). V. Reciprocal transplant experiments. *Evolution* 51: 95-102.
- Williams J.H., Boecklen W.J. & Howard D.J., 2001 - Reproductive processes in two oak (*Quercus*) contact zones with different levels of hybridization. *Heredity* 87: 680-90.
- Winge Ö., 1917 - The chromosomes: their number and general importance. *Comptes Rendues des Travaux du Laboratoire Carlesberg* 13, 131-275.
- Zanetto A., Roussel G. e Kremer A., 1994 - Geographical variation of inter-specific differentiation between *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt) Liebl. *Forest Genetics*, 1: 111-123.
- Zhou Z. K., 1992 - Origin, phylogeny and dispersal of *Quercus* from China. *Acta Botanica Yunnanica* 14: 227-236

## Appendice

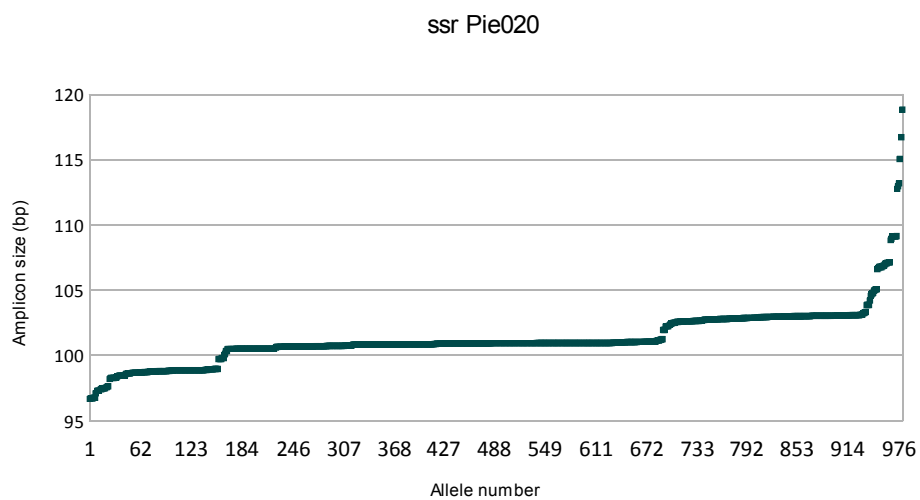


Fig. 1. Distribuzione della taglia dei 980 alleli riscontrati per l'est-ssr Pie020.

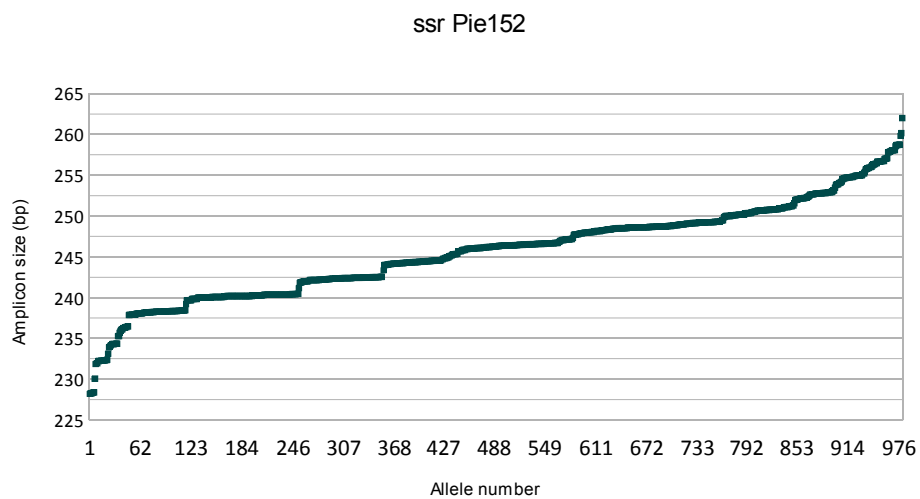


Fig. 2. Distribuzione della taglia dei 980 alleli riscontrati per l'est-ssr Pie152.

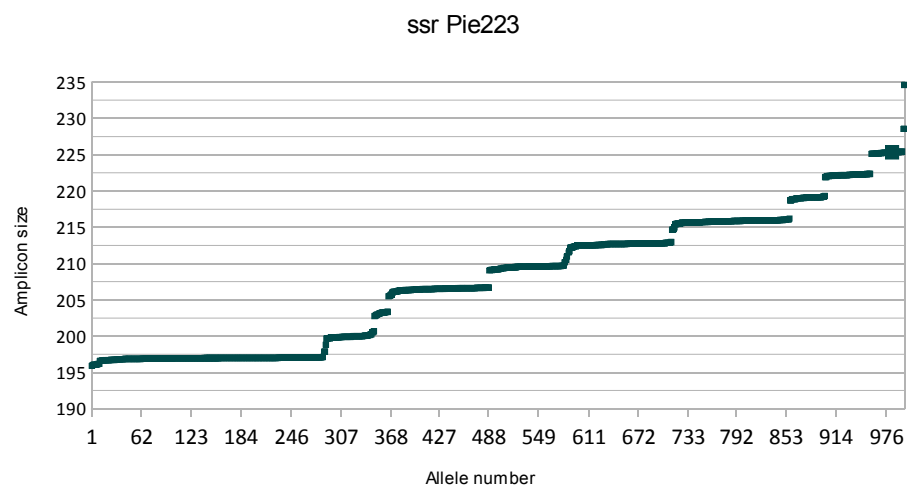


Fig. 3. Distribuzione della taglia dei 998 alleli riscontrati per l'est-ssr Pie223.



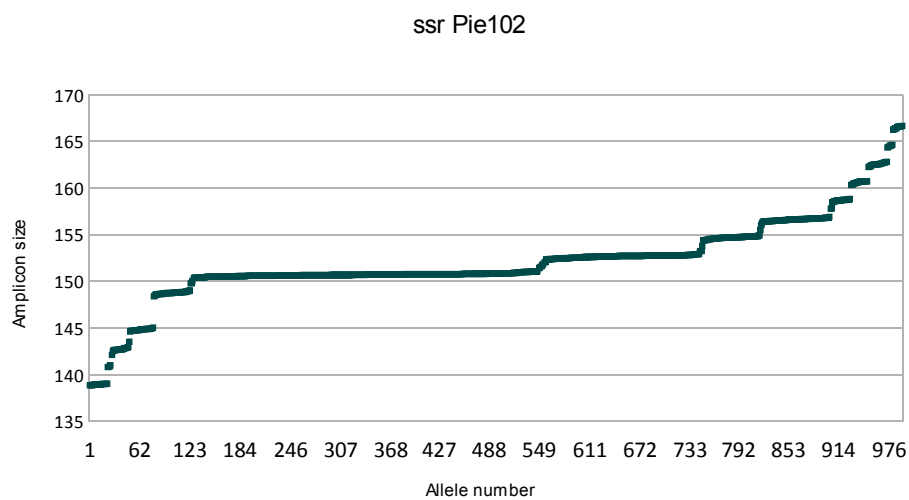


Fig. 4. Distribuzione della taglia dei 992 alleli riscontrati per l'est-ssr Pie102.

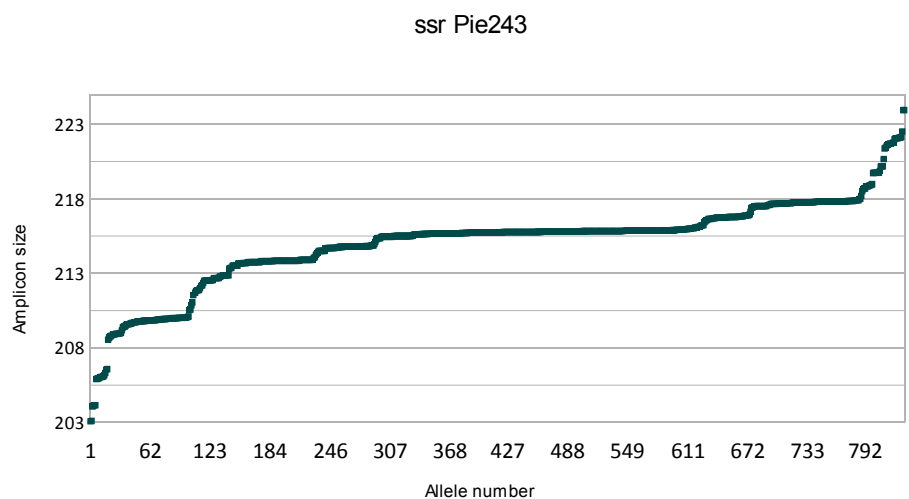


Fig. 5. Distribuzione della taglia degli 832 alleli riscontrati per l'est-ssr Pie243.

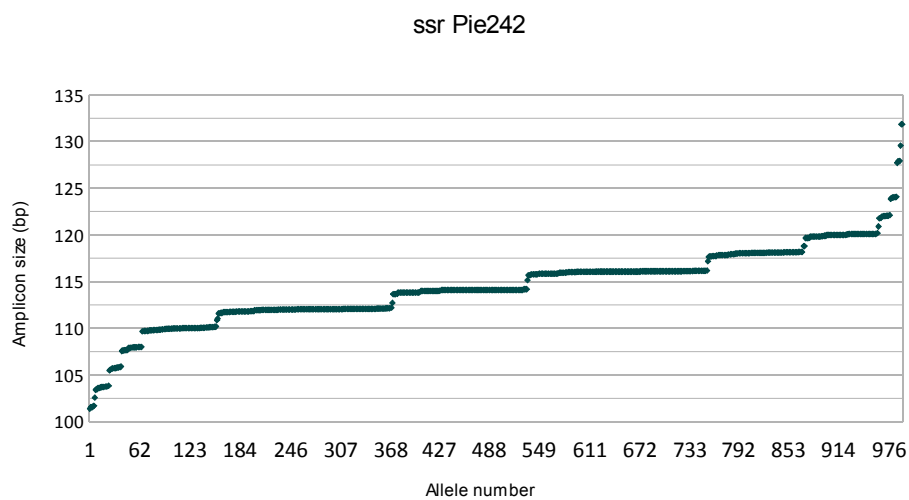


Fig. 6. Distribuzione della taglia dei 992 alleli riscontrati per l'est-ssr Pie242.

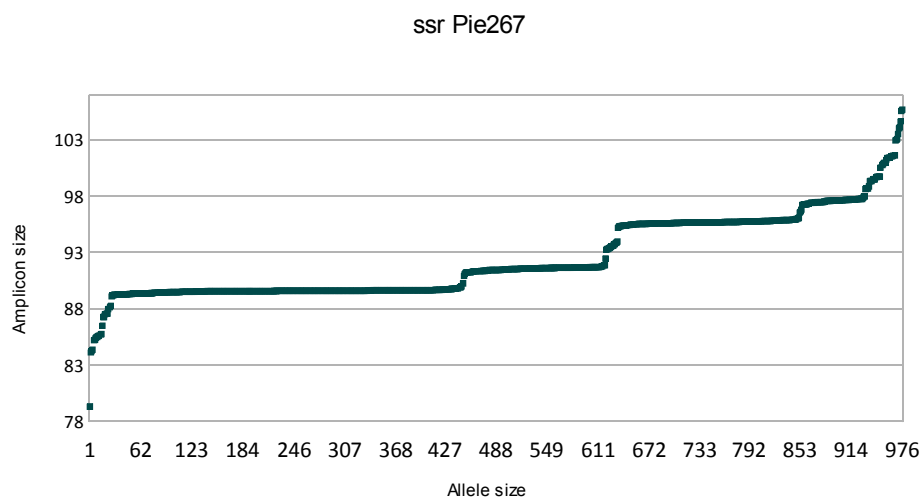


Fig. 7. Distribuzione della taglia dei 976 alleli riscontrati per l'est-ssr Pie267.

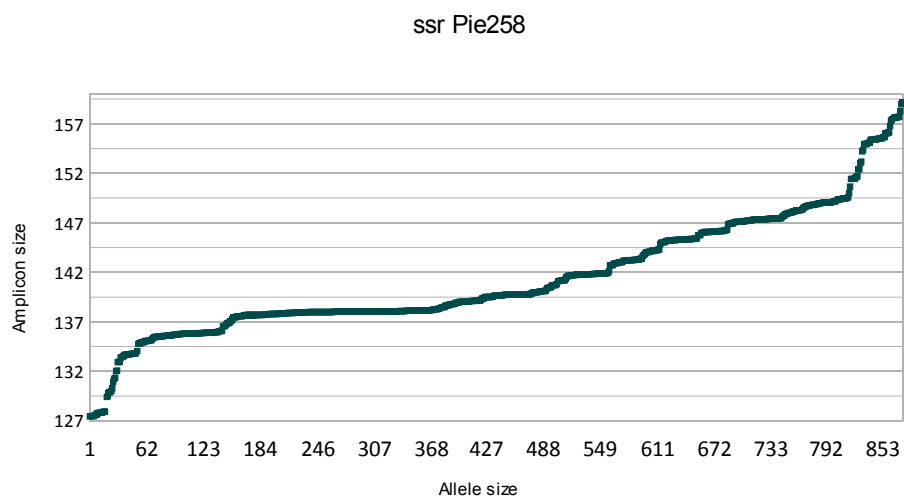


Fig. 8. Distribuzione della taglia degli 874 alleli riscontrati per l'est-ssr Pie258.

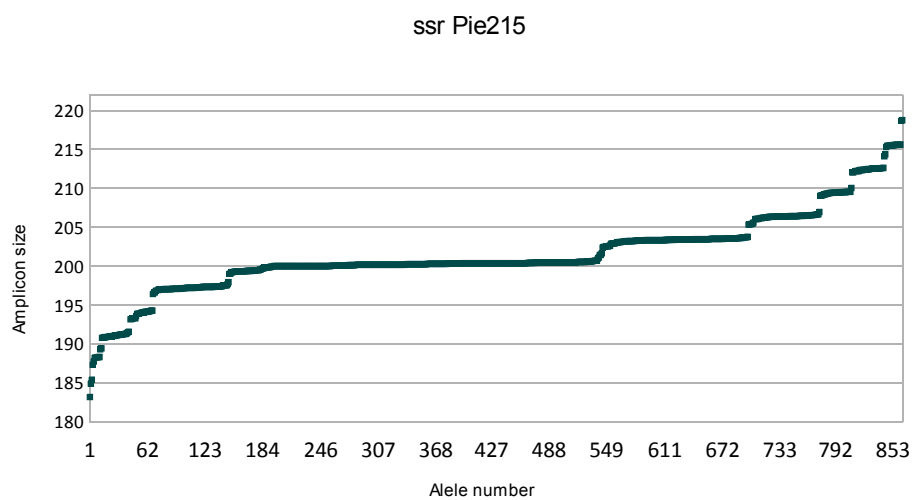


Fig. 9. Distribuzione della taglia degli 863 alleli riscontrati per l'est-ssr Pie215.

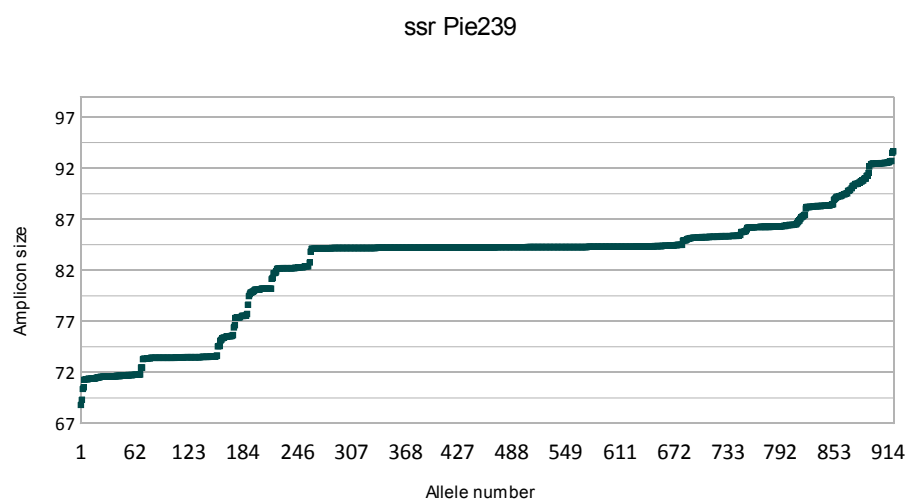


Fig. 10. Distribuzione della taglia dei 920 alleli riscontrati per l'est-ssr Pie239.

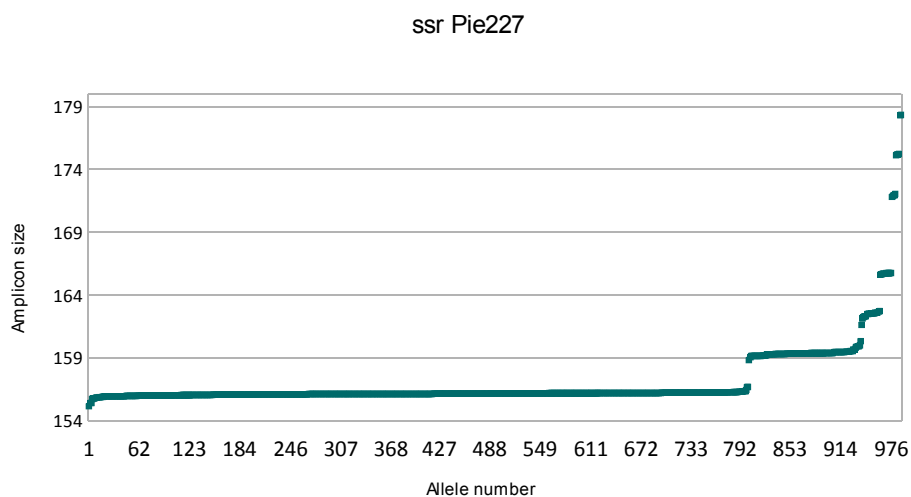


Fig. 11. Distribuzione della taglia dei 988 alleli riscontrati per l'est-ssr Pie227.

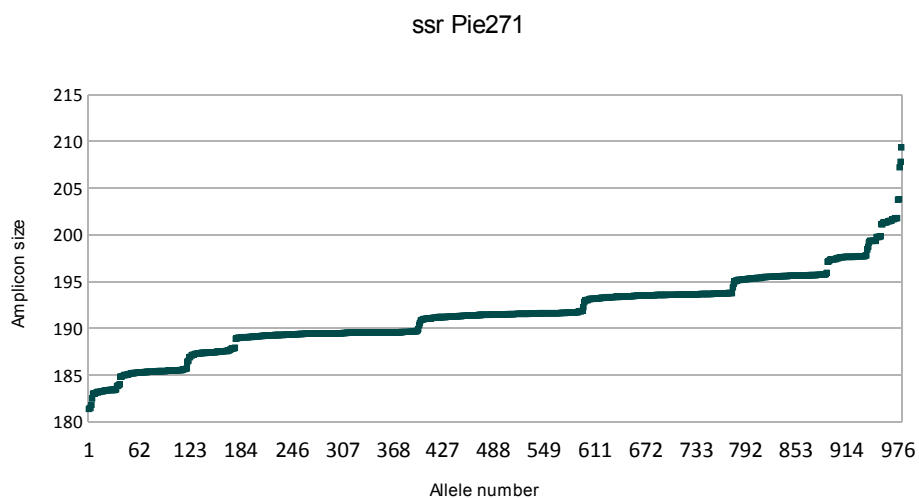


Fig. 12. Distribuzione della taglia dei 980 alleli riscontrati per l'est-ssr Pie271.

alleles	PIE020	PIE223	PIE152	PIE242	PIE102	PIE243	PIE267	PIE258	PIE215	PIE239	PIE227	PIE271
	97	197	228	102	139	206	86	128	185	69	156	184
	99	200	230	104	141	210	90	130	188	71	159	186
	101	203	232	106	143	212	92	134	191	73	162	188
	103	206	234	108	145	214	96	136	194	75	165	190
	105	209	236	110	147	216	98	138	197	77		192
	107	212	238	112	149	218	100	140	200	79		194
	109	216	240	114	151	220	102	143	203	81		196
	113	219	242	116	153	222	104	145	206	85		198
	115	222	244	118	155		106	147	209	87		200
		225	246	120	157			149	212	89		202
		228	248	122	159			151	215	91		204
			250	124	161			153	218	93		
			252		163			155	221	94		
			254		165			157				
			256		167							
			258		169							
			259									
			260									
<b>tot 138</b>	9	11	18	12	16	8	9	14	13	13	4	11

Tab. 2. Forme alleliche (in bp) individuate nei campioni molisano dell'area di Monte Vairano.

alleles	PIE020	PIE223	PIE152	PIE242	PIE102	PIE243	PIE267	PIE258	PIE215	PIE239	PIE227	PIE271
	97	197	232	102	139	204	80	128	188	69	156	184
	99	200	234	104	141	210	86	132	191	71	159	186
	101	203	236	106	143	212	88	134	194	73	162	188
	103	206	238	110	145	214	90	136	197	75	165	190
	105	209	240	112	149	216	92	138	200	77	175	192
	107	212	242	114	151	218	94	140	203	79		194
	109	216	244	116	153	220	96	143	206	81		196
	113	219	246	118	155	222	98	145	209	85		198
	119	222	248	120	157		100	147	212	87		202
		225	250	122	159		102	149	215	89		
			252	124	161			153	218	91		
			254	128	163			155		93		
			256		165			157		96		
			258		167							
			259									
			260									
			262									
<b>tot 131</b>	9	10	17	12	14	8	10	13	11	13	5	9

Tab. 3. Forme alleliche (in bp) individuate nei campioni laziali.

alleles	PIE020	PIE223	PIE152	PIE242	PIE102	PIE243	PIE267	PIE258	PIE215	PIE239	PIE227	PIE271
	97	197	232	102	139	204	84	128	185	79	156	184
	99	200	234	104	143	206	86	130	188	81	159	186
	101	203	236	106	145	210	88	132	191	85	162	188
	103	206	238	108	149	212	90	134	194	87	165	190
	105	209	240	110	151	214	92	136	197	89		192
	107	212	242	112	153	216	94	138	200	91		194
	109	216	244	114	155	218	96	140	203	93		196
	113	219	246	116	157	220	98	143	206			198
	115	222	248	118	159	222	100	145	209			200
		225	250	120	161		102	147	212			202
		234	252	122	163		104	149	215			204
			254	124	165		106	151	218			
			256	128	167			153				
			258	132				155				
			259					157				
			260					159				
<b>tot 134</b>	9	11	16	14	13	9	12	16	12	7	4	11

Tab. 4. Forme alleliche (in bp) individuate nei campioni pugliesi.

### **Articoli prodotti**

Antonecchia G., Fortini P, Lepais O, Gerber S, Legér P, Scippa G, Viscosi V. Genetic structure of a natural oak community in central Italy: evidence of gene flow among three sympatric white oak species (*Quercus, fagaceae*). In prep.

Fortini P., Antonecchia G., Di Marzio P., Maiuro L., Viscosi V., 2013 - Role of micromorphological leaf traits and molecular data in taxonomy of three sympatric white oak species and their hybrids (*Quercus* L. ). Plant Biosystems, DOI: 10.1080/11263504.2013.868374.

Viscosi V., Antonecchia G., Lepais O., Fortini P., Gerber S., Loy A., 2012 - Leaf shape and size differentiation in white oaks: assessment of allometric relationships among three sympatric species and their hybrids. International Journal of Plant Sciences 173: 875-884.